

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Molekularbiologie

**Die Wirkung von hCG auf die Dezidualisierung ektooper
endometrialer Läsionen als therapeutischer Ansatz zur
Behandlung der Endometriose**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften in der Medizin
durch die Medizinische Fakultät der
Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Yvonne Koch
aus Wuppertal
2013

Dekan:	Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1.Gutachter:	Frau Prof. Dr. rer. nat. R. Grümmer
2.Gutachter:	Herr Priv-Doz. Dr. med. M. L. Heubner

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember 2013

Teilaspekte dieser Arbeit wurden auf Tagungen vorgestellt oder als Abstracts veröffentlicht:

Koch Y, Sannecke C, Tötsch M, Wimberger P, Kimmig R, Winterhager E, Grümmer R (2011): Induktion der Dezidualisierung in humanen ektopen endometrialen Läsionen *in vivo*. J Reprod.Med.Endokrinol. 1: 37.

Koch Y, Wimberger P, Kimmig R, Winterhager E, Grümmer R (2011): Induction of Decidualization in human ectopic endometrial lesions *in vivo*. Proceedings of the 6th International Conference on the Female Reproductive Tract, Frauenchiemsee.

Koch Y, Wimberger P, Kimmig R, Winterhager E, Grümmer R (2011): Induction of Decidualization in human ectopic endometrial lesions *in vivo*. Proceedings of the 11th World Congress on Endometriosis, Montpellier.

Grümmer R, Wimberger P, Kimmig R, Koch Y (2012): Decidualization in human ectopic endometrial lesions *in vivo* is induced by hCG. Proceedings of the 28th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction & Embryology (ESHRE), Istanbul.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung	1
1.1 Endometriose.....	1
1.1.1 Definition und Pathogenese	1
1.1.2 Symptomatik und Diagnostik.....	4
1.1.3 Aktuelle Therapieoptionen	5
1.2 Entwicklung neuer Therapien zur Behandlung der Endometriose.....	8
1.3 Die Dezidualisierung.....	9
1.4 Das heterologe Mausmodell zur Untersuchung der Endometriose.....	11
1.5 Zielsetzung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Chemikalien	14
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3 Laborgeräte.....	17
2.1.4 Enzyme.....	18
2.1.5 Molekularbiologische und proteinbiochemische Kits.....	18
2.1.6 Kulturmedien, Puffer und Lösungen	19
2.1.7 bp-Längenstandards/Molekulargewichtsstandards	20
2.1.8 Oligonukleotide	20
2.1.9 Antikörper	21
2.1.10 Software und Datenbanken	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Humanes Endometriumgewebe.....	22
2.2.2 Tierexperimentelle Arbeiten	23
2.2.2.1 Versuchstiere	23
2.2.2.2 Transplantation des endometrialen Gewebes	23
2.2.2.3 Substanzapplikationen.....	24
2.2.2.4 Entnahme der transplantierten Fragmente.....	24
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	25
2.2.3.1 RNA-Isolierung aus Gewebe	25

2.2.3.2	Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren.....	25
2.2.3.3	Reverse Transkription (RT)	26
2.2.3.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.2.3.5	Agarosegelelektrophorese	27
2.2.3.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	28
2.2.3.7	Quantitative Echtzeit-PCR	28
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	30
2.2.4.1	Proteinextraktion aus Gewebe.....	30
2.2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	30
2.2.4.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.2.4.4	Western Blot.....	31
2.2.4.5	Proteinfärbung auf der Nitrozellulosemembran	32
2.2.4.6	Immundetektion von Proteinen auf der Nitrozellulosemembran	32
2.2.4.7	Chemilumineszenz-Nachweis (ECL-Reaktion)	33
2.2.5	Morphologische Methoden	33
2.2.5.1	Histologische Analyse.....	33
2.2.5.2	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	34
2.2.5.3	Immunhistochemische Analyse.....	34
2.2.6	Statistische Auswertung	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Validierung der Oligonukleotid-Primer	37
3.2	Effekt von Progesteron in Kombination mit cAMP-steigernden Substanzen auf die Dezidualisierung.....	37
3.2.1	Effekt auf das Uterusgewicht der Maus	38
3.2.2	Effekt auf die humanen ektopen endometrialen Läsionen	39
3.2.2.1	Größe und Gewicht der ektopen humanen endometrialen Läsionen	39
3.2.2.2	Morphologie der ektopen humanen endometrialen Läsionen	40
3.2.2.3	Expression von Dezidualisierungsmarkern in den ektopen humanen endometrialen Läsionen	41
3.2.2.4	Proliferation der ektopen humanen endometrialen Läsionen.....	48
3.3	Vergleich des Effektes der Kombination von hCG mit Progesteron bzw. Medroxyprogesteronacetat (MPA) auf die Dezidualisierung	50
3.3.1	Effekt auf das Uterusgewicht der Maus	51

3.3.2	Effekt auf die humanen ektopen endometrialen Läsionen	51
3.3.2.1	Größe und Gewicht der ektopen humanen endometrialen Läsionen	51
3.3.2.2	Morphologie der ektopen humanen endometrialen Läsionen	52
3.3.2.3	Expression von Dezidualisierungsmarkern in den ektopen humanen endometrialen Läsionen	53
3.3.2.4	Proliferation der ektopen humanen endometrialen Läsionen.....	57
3.4	Entzug von Dezidualisierungsinduktoren	58
3.4.1	Effekt auf das Uterusgewicht der Maus	59
3.4.2	Effekt auf die humanen ektopen endometrialen Läsionen.....	59
3.4.2.1	Größe und Gewicht der ektopen humanen endometrialen Läsionen	59
3.4.2.2	Morphologie der ektopen humanen endometrialen Läsionen	60
3.4.2.3	Expression von Dezidualisierungsmarkern in den ektopen humanen endometrialen Läsionen	61
3.4.2.4	Proliferation der ektopen humanen endometrialen Läsionen.....	65
3.5	Einfluss der verschiedenen Behandlungen auf die Apoptoserate von ektopen endometrialen Läsionen	66
4	Diskussion	69
4.1	Induktion der Dezidualisierung ektopen Endometriums <i>in vivo</i>	69
4.2	Vergleich des Effektes von Progesteron und MPA auf die Dezidualisierung	76
4.3	Entzug von Dezidualisierungsinduktoren	77
4.4	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	78
5	Zusammenfassung.....	81
6	Literaturverzeichnis.....	82
7	Anhang	92
7.1	Abbildungsverzeichnis	92
7.2	Abkürzungen	93
8	Danksagung.....	96
9	Lebenslauf	97

1 Einleitung

1.1 Endometriose

1.1.1 Definition und Pathogenese

Die Endometriose zählt zu den häufigsten benignen gynäkologischen Erkrankungen bei Frauen im reproduktionsfähigen Alter und ist pathologisch durch das Vorkommen von endometrialem Gewebe mit charakteristischen funktionsfähigen Drüsen und Stromazellen außerhalb der Gebärmutter (Cavum uteri) definiert. Die auftretende Form der Endometriose wird aufgrund der Lage der Endometrioseherde in die peritoneale Endometriose (Peritoneum), die ovarielle Endometriose (Eierstöcke) und die rektovaginale bzw. tief infiltrierende Endometriose (im Bereich der Bindegewebsplatte zwischen Rektum und Vagina) unterteilt (Donnez et al., 1995), wobei die peritoneale Endometriose die häufigste Form darstellt. Alle drei Erscheinungsformen unterscheiden sich in Pathogenese, Symptomatik, Krankheitsverlauf und infolgedessen in der Behandlung (Dunselman et al., 2001). Die versprengten Endometrioseherde verfügen meistens ähnlich wie uterines (eutopes) Endometrium über Östrogen- und Progesteronrezeptoren, weshalb Proliferation und Funktion der versprengten Endometrioseherde durch ovarielle Hormone gesteuert werden können. Es konnte gezeigt werden, dass in 70% der Patientinnen das ektope endometriale Gewebe während des 28tägigen Monatszyklus analog zum eutopen Endometrium wächst, in manchen Fällen jedoch das ektope Drüsenepithel sowie Stroma unabhängig von der Zyklusphase zu sein scheint (Bergqvist et al., 1984). Das könnte dadurch begründet sein, dass geringere Expressionslevel der beiden Hormonrezeptoren in den Endometrioseherden im Vergleich zum eutopen Endometrium beobachtet wurden (Bergqvist et al., 1985b). Darüberhinaus manifestiert sich die Erkrankung sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch sehr heterogen. Die endometriotischen Läsionen können sehr klein sein, es kann jedoch vor allem an den Eierstöcken zur Entwicklung größerer, blutgefüllter Zysten kommen (Metzger et al., 1988). Die Klassifikation der Läsionen erfolgt nach Richtlinien der revidierten Version der American Society for Reproductive Medicine (rASRM-Klassifikation (1997)). Dabei wird der Schweregrad der Erkrankung in 4 Stadien von minimal bis schwer unterteilt (I = minimal; II = gering; III = mäßig; IV = schwer). Für die Einteilung wird ein Punktesystem verwendet, welches sich auf die Anzahl, Größe und Lokalisation der Läsionen stützt. Zusätzlich wird die Aktivität

durch eine Beschreibung der Färbung der Endometrioseherde in die Klassifikation einbezogen. Rote Läsionen zeigen eine starke Vaskularisierung und mitotische Aktivität (Donnez et al., 1994; Nisolle et al., 1993). Diese Läsionen sind aggressiv, stellen das erste Stadium der Erkrankung dar und entwickeln sich zu schwarz-braunen Läsionen weiter (Donnez et al. 1995, 1996). Verglichen mit roten Läsionen sind schwarz-braune Läsionen weniger aktiv und werden von fibrotischem Gewebe umgeben (Donnez et al. 1995, 1996). Weiße Läsionen zeigen eine geringe mitotische Aktivität und eine schwache stromale Vaskularisierung. Daher wird davon ausgegangen, dass sich diese Läsionen im Ruhestadium befinden (Nisolle et al., 1993; Donnez et al., 1996).

Sowohl die Pathogenese als auch die Ätiologie der verschiedenen Formen der Endometriose sind bis heute nicht abschließend geklärt. Die beiden wichtigsten Theorien zur Entstehung der Endometriose sind die Metaplasietheorie und die Implantations-/Transplantationstheorie. Bei der Metaplasie-Theorie, welche Anfang des letzten Jahrhunderts von Robert Meyer entwickelt wurde, wird angenommen, dass sich die Endometrioseherde durch Umwandlung (Metaplasie) aus pluripotenten Zellen des Coelomepithels unter Einfluss von Östrogenen - mit oder ohne andere Kofaktoren wie z.B. inflammatorische Stimuli - bilden (Gardner et al., 1953). Das - wenn auch seltene - Auftreten von Endometriose bei Östrogen-behandelten Männern spricht für diese Theorie (Pinkert et al., 1979; Schrodt et al., 1980). In Erweiterung der Metaplasie-Theorie geht die Induktionstheorie davon aus, dass diese Transformation undifferenzierter Zellen in endometriumähnliche Zellen auch durch Substanzen induziert werden kann, welche während der Menstruation in der Peritonealflüssigkeit vorhanden sind (Merrill, 1966). Auch der Ursprung der rekto-/vaginalen Endometriose wird mit der Metaplasie-Theorie erklärt (Donnez et al. 1995, 1996). Das Konzept der Implantations- bzw. Transplantationstheorie beinhaltet, dass während der Menstruation überlebende endometriale Zellen durch einen Rückfluss über die Eileiter (Tuben) in die Bauchhöhle gelangen (retrograde Menstruation), dort an unterschiedlichsten peritonealen Oberflächen implantieren und über die Fähigkeit kontinuierlichen Wachstums verfügen (Sampson, 1927). Die Transplantationstheorie wird durch die Beobachtungen untermauert, dass 77% der Frauen mit Vaginalobstruktionen eine peritoneale Endometriose ausbilden (Olive und Henderson, 1987), Frauen bei hormoneller Unterdrückung des Menstruationszyklus und Frauen in der postmenopausalen Phase aber nur selten eine Endometriose entwickeln (Punnonen et al., 1980). Zusätzlich geht die Transplantationstheorie davon aus, dass

endometriales Gewebe durch Blut- oder Lymphgefäße oder durch operative Eingriffe aus dem Cavum uteri verschleppt werden und extrauterin implantieren kann (Sampson, 1927; Javert, 1949). Die Transplantationstheorie gilt für die Entstehung der peritonealen Endometriose als recht gesichert und bietet auch eine Erklärung für seltene und ungewöhnliche Implantationsorte wie Lymphknoten, Lunge und Gehirn. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass das Risiko Endometriose zu entwickeln durch eine verkürzte Zyklus- und eine verlängerte Menstruationsdauer erhöht wird (Cramer et al., 1986; Arumugam und Lim, 1997; Vercellini et al., 1997) und somit der Umfang der retrograden Menstruation eine wichtige Rolle spielt (D'Hooghe et al., 2003). Obwohl davon ausgegangen wird, dass es bei neun von zehn Frauen zu einer retrograden Menstruation kommt, adhärert das endometriale Gewebe nur bei einer von zehn Frauen an das Peritoneum und proliferiert sowie invadiert in das darunterliegende Gewebe, so dass endometriale Läsionen entstehen (Koninckx et al., 1980; Blumenkrantz et al., 1981; Halme et al., 1984). Daher müssen zusätzliche Faktoren beteiligt sein, welche die Entstehung einer Endometriose fördern. In verschiedenen Studien werden veränderte immunologische Prozesse als Ursache für die Entstehung einer Endometriose genannt. Eine Reduktion der humoralen und zellvermittelten Zytotoxizität und somit ein gestörter immunologischer Abwehrmechanismus wird beschrieben, der letztendlich auch bei kleineren Mengen menstruellen Gewebes für das Auftreten einer ektopen Implantation des Endometriums verantwortlich sein kann (Dmowski et al., 1989; Vigano et al., 1991; Oosterlynck et al., 1991). In der Peritonealflüssigkeit von an Endometriose erkrankten Frauen ist die Zahl der aktivierten Makrophagen erhöht (Muscato et al., 1982; Halme et al., 1982). Diese vermehrten aktivierten peritonealen Makrophagen in Endometriosepatienten produzieren Wachstumsfaktoren, welche Implantation und Wachstum der durch retrograde Menstruation in die Peritonealhöhle gelangten endometrialen Zellen verstärken könnten (Kauma et al., 1988). Zusätzlich ist die Zahl der Lymphozyten und der Komplementfaktoren C3c und C4 in der Peritonealflüssigkeit erkrankter Frauen signifikant erhöht (Badawy et al., 1984) und somit auch die Konzentration vieler peritonealer Faktoren wie TNF-alpha (Eisermann et al., 1988), Matrix-Metallo-Proteinasen, Wachstumsfaktoren etc., welche die Adhäsion des ektopischen Endometriums an das Peritoneum und nachfolgend die Invasion und die Angiogenese der Läsionen fördern (Zhang et al., 1993; D'Hooghe und Debrock, 2002). Eine genetische Prädisposition für die Entwicklung der Erkrankung ist ebenfalls nicht auszuschließen, da die Prävalenz von Endometriose sich um 7% erhöht, sobald Verwandte ersten Grades von der Erkrankung betroffen sind (Malinak et

al., 1980; Lamb et al., 1986). Es wird davon ausgegangen, dass der Endometriose eine multifaktorielle Ätiologie zugrunde liegt, bei der sowohl genetische, immunologische als auch hormonelle Faktoren zum Tragen kommen. Genaue Zahlen zur Prävalenz von Endometriose gibt es nicht, da nur bei einem Teil der betroffenen Frauen typische Beschwerden auftreten. Oft wird eine Endometriose nur zufällig entdeckt und daher häufig erst nach vielen Jahren der Erkrankung diagnostiziert (Gao et al., 2006). Es wird geschätzt, dass etwa 10% der weiblichen Bevölkerung im reproduktionsfähigen Alter von Endometriose betroffen sind (Eskenazi und Warner, 1997; Grummer, 2006; Simoens et al., 2007). Bei Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch ist der Anteil betroffener Frauen erheblich höher. Je nach Literaturangabe beträgt dieser zwischen 40 bis 60% (D'Hooghe et al., 2004).

1.1.2 Symptomatik und Diagnostik

Die Intensität und die Art der Beschwerden stehen nicht zwingend im Zusammenhang mit dem Grad der Ausprägung der Endometriose (Vernon et al., 1986; Kennedy et al., 2005; Simoens et al., 2007). Patientinnen mit einer ausgedehnten Erkrankung können symptomfrei sein, während Patientinnen mit einer nur minimalen Ausbreitung und Größe der versprengten Endometrioseherde unter gravierenden klinischen Symptomen leiden können (Mahmood und Templeton, 1990). Viele der betroffenen Frauen leiden unter Zyklusstörungen (Zwischenblutungen und Schmierblutungen), einer ausgeprägten Regelblutung, die meist lange anhält (Menorrhagie) und/oder einer schmerzhaften Regelblutung (Dysmenorrhoe). Mitunter halten die chronischen Unterleibs- und Rückenschmerzen über einen längeren Zeitraum an oder treten völlig unabhängig vom Zyklus auf und führen dadurch zu einer verminderten Lebensqualität. Liegen die Endometrioseherde in der Bauchhöhle zwischen dem Darm und der Gebärmutter (Douglas-Raum), können sie zu Schmerzen beim Geschlechtsverkehr (Dyspareunie) führen (Gao et al., 2006). Häufig korreliert die Endometriose mit Subfertilität (Story und Kennedy, 2004). Der ursächliche Zusammenhang zwischen Endometriose und Subfertilität ist allerdings nicht geklärt und bisher wurde kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Erkrankung und der Subfertilität gefunden. Zum einen können Verwachsungen und Vernarbungen in den für die Schwangerschaft wichtigen Organen wie den Eileitern und Eierstöcken den Transport der Eizelle behindern und so zur Subfertilität führen. Zum

anderen spielen - wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben - wahrscheinlich inflammatorische Prozesse wie z.B. die erhöhte Anzahl aktivierter Makrophagen und die dadurch erhöhten Interleukin 1- und Prostanoidderivatkonzentrationen in der Peritonealflüssigkeit eine Rolle (Halme et al., 1982; Drake et al., 1983). Es können aber auch verschiedene Faktoren im eutopen Endometrium erkrankter Frauen per se verändert sein und zu einer reduzierten Rezeptivität des Endometriums führen (Kao et al., 2003).

Um eine peritoneale Endometriose zu diagnostizieren wird üblicherweise eine laparoskopische Untersuchung durchgeführt. Nur so ist es möglich, auch milde Formen der Endometriose zu erfassen. Sichtbare Endometrioseherde werden dabei operativ entfernt und idealerweise histologisch analysiert, um die Diagnose abzusichern (Galle, 1989; Kennedy et al., 2005). Entnommene Endometrioseherde zeigen eine klassische benigne Morphologie des Endometriums mit Drüsen und umgebendem Stroma. Zur Diagnose einer ovariellen Endometriose ist eine nicht-invasive Ultraschalluntersuchung üblich. Ihre Diagnosegenauigkeit kann durch Kombination mit einer Farbdopplerultrasonographie verbessert werden (Brosens, 1997). Zusätzliche Hilfen zur Diagnose der ovariellen und tief infiltrierenden Endometriose sind die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie. Allerdings kann auch hier eine sichere Diagnose nur nach Gewebeentnahme und anschließender histopathologischer Untersuchung gestellt werden (Rock und Markham, 1992).

1.1.3 Aktuelle Therapieoptionen

Bis heute lässt sich eine Endometriose nicht vollständig heilen. Mangelnde Kenntnisse über die Pathogenese der Endometriose erschweren die Entwicklung neuer wirksamer Therapiestrategien (Grummer, 2006). Zur Zeit wird die Endometriose medikamentös, operativ oder mit einer Kombination aus beidem therapiert. Die Entfernung der Endometrioseherde bei einer operativen Laparoskopie ist normalerweise die erste Therapiewahl. Bei dieser Therapie tritt jedoch eine hohe Rezidivrate auf. Dieser operative Eingriff, wenngleich auch mit minimaler invasiver Operationstechnik durchgeführt, stellt für die Patientinnen ein potenzielles Risiko dar und sollte daher nicht unbegrenzt wiederholt werden. Da es bisher keine spezifische und nachhaltige, ursächlich wirkende medikamentöse Behandlung gibt, ist das Ziel einer medikamentösen Therapie ein Milieu zu schaffen, welches das Fortbestehen der ektopen Läsionen verhindert und die Resorption

und/oder Regression dieser ektopen Läsionen verstärkt (Metzger et al., 1988). Die aktuellen Behandlungsmöglichkeiten beschränken sich daher auf die Reduzierung der Symptomatik, um einen Zugewinn an Lebensqualität zu ermöglichen.

Da in Endometrioseläsionen eine erhöhte Expression von Zykllooxygenase nachgewiesen werden konnte (Chishima et al., 2002), werden in der Therapie der Endometriose nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) als Schmerzmittel eingesetzt. NSAR wirken über die Hemmung des Enzyms Zykllooxygenase, vermindern dadurch die Synthese von Prostaglandinen und blockieren die Entzündungs- und Schmerzkaskade. Die Wirkstoffklasse der nichtselektiven NSAR, welche beide Zykllooxygenasen - COX-1 und COX-2 - hemmen, führen jedoch durch die Hemmung der Zykllooxygenase-1 zu gastrointestinalen sowie renalen Störungen und in Einzelfällen auch zu Blutungsstörungen. Selektive COX-2-Inhibitoren, die zweite Wirkstoffklasse der NSAR, verfügen über eine bessere Verträglichkeit als COX-1-Inhibitoren. Inzwischen wurde jedoch einigen COX-2-Inhibitoren die Zulassung aufgrund potenzieller kardialer Nebenwirkungen entzogen, so dass diese nun nicht mehr routinemäßig zur Behandlung der Endometriose eingesetzt werden.

Begleitend zur chirurgischen wird meistens eine endokrine Behandlung der Endometriose durchgeführt, da es sich bei der Endometriose um eine Östrogen-abhängige Erkrankung handelt und beobachtet wurde, dass sich Endometrioseherde während einer Amenorrhoe, besonders während der Schwangerschaft, verkleinern oder ganz zurückbilden (Dizerega et al., 1980). Die Östrogensynthese wird daher medikamentös supprimiert und somit der hormonelle Zyklus blockiert, um das Wachstum der Endometrioseherde oder das Wiederauftreten der Endometriose nach einer operativen Laparoskopie zu verzögern. Geeignet sind sogenannte Gonadotrophin-Releasing-Hormon (GnRH)-Agonisten, Östrogen-Gestagen-Kombinationen (orale Kontrazeptiva) oder verschiedene Gestagene (Giudice und Kao, 2004). Das Testosteron-Derivat Danazol, welches früher verbreitet zur Behandlung der Endometriose eingesetzt wurde, wird heute aufgrund seiner androgenen Partialwirkung kaum noch eingesetzt. Die Gabe von Aromatase-Hemmern wird als ein vielversprechender neuer hormoneller Therapieansatz gehandelt. Noch sind keine Aromatase-Hemmer ausdrücklich zur Behandlung der Endometriose zugelassen.

Die allgemein übliche medikamentöse Therapie der Endometriose ist die Behandlung mit GnRH-Agonisten zur Induktion eines hypoöstrogenen Status. Dabei handelt es sich um Substanzen, welche kompetitiv zum endogenen GnRH an die entsprechenden Rezeptoren binden und die Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse blockieren. Nach anfänglichem

Anstieg der Gonadotropinwerte kommt es nach wenigen Tagen durch die kontinuierliche Stimulation der hypophysären Zellen zu einer Desensitivierung dieser Zellen, dadurch zu einer Herunterregulation von FSH (Follikelstimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierendes Hormon) und zur Hemmung der Steroidsynthese in den Ovarien. Die Behandlung mit einem GnRH-Agonisten führt zu einer Amenorrhoe und zu einer Reduktion der Endometrioseläsionen und der endometrioseassoziierten Symptome. Die starke Absenkung der Serum-Östrogenkonzentration führt jedoch zu klimakterischen Beschwerden wie u.a. Hitzewallungen, Kopfschmerzen, Depressionen, Leistungsschwäche, Veränderungen der vaginalen Schleimhäute sowie einer verminderten Libido und einer Knochendemineralisierung. Um der signifikanten Abnahme der Knochendichte entgegenzuwirken, muss spätestens nach sechs Monaten eine Add-back-Therapie mit Östrogenen durchgeführt werden, wobei jedoch überprüft werden muss, ob es unter der Add-back-Therapie nicht wieder zu einem Wachstum der Endometrioseläsionen kommt.

Der Einsatz oraler Kontrazeptiva stellt eine weitere gängige medikamentöse Therapieoption dar. Dabei handelt es sich um Hormonpräparate aus synthetischen Östrogenen kombiniert mit unterschiedlichen Gestagenen. Das Konzept bei der Gabe von oralen Kontrazeptiva zur Behandlung der Endometriose beruht auch hier auf ihrer Gonadotropin-inhibierenden Wirkung, wodurch die ovarielle Östrogensekretion gehemmt wird. Durch den daraus resultierenden hypoöstrogenen, hypergestagenen Zustand kommt es zu einer Abschwächung der Beschwerden. Die Behandlung hat aber nur einen geringen Einfluss auf die Ausprägung der Endometrioseherde. Die meisten oralen Kontrazeptiva sind zudem nicht ausdrücklich zur Behandlung der Endometriose zugelassen.

Bei der Gabe von Gestagenen bzw. Progestagenen (synthetische Gestagene) zur Behandlung der Endometriose wird der Organismus in einen schwangerschaftsähnlichen Zustand versetzt, wobei die Östradiol-abhängige LH-Ausschüttung blockiert wird. Dies führt nach mehreren Monaten der Einnahme zur anfänglichen Dezidualisierung des endometrialen Gewebes und schließlich zur Atrophie der Endometrioseläsionen. Bei längerfristiger Therapie kann es jedoch auch hierbei zu einem ausgeprägten klimakterischen Syndrom kommen.

Die zurzeit gängigen endokrinen Behandlungen greifen somit gravierend in den Hormonhaushalt ein. Es ist erforderlich, die Medikamente bis zu sechs Monate einzunehmen um eine Wirkung zu erzielen (Simoens et al., 2007) und die Rezidivrate bei der nur medikamentös behandelten Endometriose beträgt bis zu 50 Prozent in den ersten

beiden Jahren nach der Behandlung (Nisolle-Pochet et al., 1988; D'Hooghe et al., 2004). Zudem sind die aktuellen hormonellen Behandlungsmethoden bei Patientinnen mit Kinderwunsch nur begrenzt anwendbar, da durch die hormonelle Therapie der weibliche Monatszyklus unterdrückt wird und die betroffenen Frauen während der Therapie nicht schwanger werden können. Seit den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden zahlreiche neue Medikamente zur Behandlung der Endometriose erprobt - jedesmal mit neuen Erwartungen - bei denen sich im Endeffekt aber nur die Höhe der Kosten und die Art der Nebenwirkungen geändert haben (Candiani et al., 1990). Aus diesem Grund besteht ohne Zweifel dringender Bedarf neue Therapiestrategien mit erträglicheren Nebenwirkungen zu entwickeln.

1.2 Entwicklung neuer Therapien zur Behandlung der Endometriose

Zurzeit wird in der Forschung das Augenmerk auf einige grundlegende zellbiologische und biochemische Pathogenesemechanismen gelenkt, um das Wachstum und die Persistenz der ektopen endometrialen Läsionen zu hemmen. Ein Ansatzpunkt stellt z.B. die Unterdrückung des Angiogeneseprozesses dar, da die Entwicklung der ektopen endometrialen Läsionen stark von der Etablierung einer ausreichenden Blutzufuhr an der Invasionsstelle abhängt und ein Persistieren der ektopen Läsionen durch eine Neovaskularisierung überhaupt erst ermöglicht wird. Weiterhin ist der Östrogenmetabolismus ein Ziel medikamentöser Strategien, da die ektopen Läsionen Östrogen-abhängig wachsen. Da Endometrioseherde in der Bauchhöhle eine inflammatorische Reaktion hervorrufen, gibt es einige Arbeitsgruppen die sich mit den dadurch entstehenden Veränderungen des Immunsystems beschäftigen und dort ein mögliches Angriffsziel einer medikamentösen Therapie sehen (Giudice und Kao, 2004).

Da inzwischen davon ausgegangen wird, dass das endometriale Stroma für die Etablierung der Endometrioseherde eine wichtige Rolle spielt (Nisolle et al., 2000a), könnte ein therapeutischer Ansatz in der terminalen Differenzierung (Dezidualisierung) dieser ektopen endometrialen Stromazellen liegen. Diese bindegewebige Umwandlung könnte letztendlich zu einer Atrophie der endometriotischen Läsionen führen. Bergqvist et al. (1985) konnten zeigen, dass ohne endometriales Stroma, welches die Drüsen umgibt, das Drüsenepithel atrophiert. Dies zeigt, dass die Bewahrung des endometrialen Stromas für die Aufrechterhaltung der normalen morphologischen Eigenschaften des glandulären

Epithels notwendig ist. Die vorliegende Arbeit fokussiert sich daher auf die Induktion der Dezidualisierung ektooper endometrialer Läsionen.

1.3 Die Dezidualisierung

Das humane Endometrium unterliegt während der gesamten weiblichen Reproduktionsphase einer zyklischen Regeneration, Umwandlung und Differenzierung. Der Menstruationszyklus wird durch die ovariellen Steroidhormone Östrogen und Progesteron gesteuert. Nach der Abstoßung des differenzierten Endometriums (Menstruation) proliferiert das Endometrium unter dem Einfluss von Östrogen. Dieser Regenerationsprozess umfasst endometriales Epithelwachstum, Angiogenese und Proliferation der endometrialen Stromazellen (Maruyama und Yoshimura, 2008). Der ovarielle Progesteronanstieg in der Lutealphase des Menstruationszyklus stoppt das rapide Wachstum der proliferativen Phase abrupt und induziert eine umfassende Umbildung des durch das Östradiol vorbereiteten Endometriums wie morphologische und funktionale Änderungen des luminalen Epithels, der epithelialen Drüsen, des Gefäßsystems und der stromalen Zellen (Jones et al., 2006). Die morphologische und biochemische Differenzierung der endometrialen Stromazellen zu Deziduazellen wird als Dezidualisierung bezeichnet. Diese beginnt in der Lutealphase des Menstruationszyklus und erreicht ihre volle Ausprägung in der Schwangerschaft nach der Einnistung des Embryos. Bei Ausbleiben einer Schwangerschaft sinkt der Progesteronspiegel im Blut, das differenzierte Endometrium wird abgestoßen und ein neuer Zyklus beginnt (Jones et al., 2006).

Histologisch ist die Dezidualisierung durch das Auftreten größerer, abgerundeter epitheloider Zellen charakterisiert, die zunächst die Spiralarterien umgeben und unter dem Mikroskop als blaß gefärbte Zellen erscheinen. Das Größenwachstum dieser Zellen wird durch die Einlagerung von Glykogen und Lipiden in das Zytoplasma hervorgerufen. Nach Implantation einer Blastozyste breitet sich die Dezidualisierung im Endometrium aus und es entwickelt sich die Decidua gravitatis. Diese morphologischen Änderungen sind mit Änderungen auf molekularer Ebene verbunden. Viele Zellfunktionen wie eine veränderte Steroidhormonrezeptorexpression und ein veränderter Steroidmetabolismus, eine Umformung der extrazellulären Matrix und des Zytoskeletts sowie eine veränderte Expression von intrazellulären Enzymen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und ihrer

Rezeptoren und Dezidua-spezifischen Transkriptionsfaktoren wurden beschrieben (Gellersen und Brosens, 2003). Als Konsequenz besitzen die dezidualisierten endometrialen Stromazellen die besondere Fähigkeit, die Trophoblastinvasion zu regulieren, inflammatorischen und oxidativen Insulten entgegenzuwirken und lokale maternale Immunantworten zu verringern (Maruyama und Yoshimura, 2008). Hauptsekretionsprodukte dezidualisierter Zellen sind deziduales Prolaktin (dPRL) und Insulin-like growth factor-binding protein 1 (IGFBP1), zwei Proteine, welche nur in dezidualisierten endometrialen Stromazellen exprimiert werden und die daher als spezifische Marker dezidualisierter Zellen eingesetzt werden (Maruyama und Yoshimura, 2008). Als früherer Dezidualisierungsmarker kann zudem die Expression des Transkriptionsfaktors Forkhead-Box-Protein O1 (FOXO1) bestimmt werden. FOXO1 wird schon zu Beginn der Dezidualisierung heraufreguliert (Lynch et al., 2009). Bei den Transmembranproteinen Connexin43 (GJA1) und CD82 handelt es sich um weitere Dezidualisierungsmarker, welche offensichtlich im endometrialen Stroma und bei der Dezidualisierung eine wichtige Rolle spielen (Gellersen et al., 2007; Ramathal et al., 2010). Die Dezidualisierung ist für die Implantation des Embryos und die nachfolgende Plazentation unerlässlich.

Es ist bekannt, dass der Dezidualisierungsprozeß beim Menschen durch Progesteron induziert wird (Huang et al., 1987; Tseng et al., 1992; Tang und Gurside, 1993). Jedoch sind die an dem Prozeß der Dezidualisierung beteiligten Faktoren und Signalwege bisher nur wenig verstanden (Jones et al., 2006; Lynch et al., 2009). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass humane endometriale Stromazellen *in vitro* in der Anwesenheit bestimmter Hormone und Wachstumsfaktoren dezidualisieren (Dimitriadis et al., 2002). Zwei voneinander unabhängige Signale können eine Dezidualisierungsreaktion in den stromalen Zellen hervorrufen. Es gibt einen Progesteronrezeptor-vermittelten und einen zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-vermittelten Signalweg (Mizuno et al., 1998). Letzterer kann aber mit dem Progesteronrezeptor-vermittelten Signalweg interagieren, unter anderem durch die Expression von Transkriptionsfaktoren, die die Funktion des Progesteronrezeptors modulieren (Gellersen und Brosens, 2003). Die Induktion der Dezidualisierung und letztendlich die Sekretion von dPRL und IGFBP-1 werden also durch eine komplexe Interaktion multipler Faktoren ausgelöst (Tseng et al., 1992).

Die Induktion der Differenzierung des ektopen Endometriums zur Dezidua bietet einen interessanten Ansatzpunkt zur Behandlung der Endometriose. Dies wird durch die Beobachtungen unterstützt, dass Endometrioseherde während einer Schwangerschaft dezidualisieren und nach der Geburt sogar apoptotisch werden können (Moen und Muus, 1991). Neben den oben aufgeführten *in vitro*-Studien gibt es bisher jedoch keine *in vivo*-Studien zur Induktion der Dezidualisierung in ektopem Endometrium. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt verschiedener Gestagene in Kombination mit cAMP-steigernden Substanzen auf die Dezidualisierung ektoper humaner endometrialer Gewebefragmente im Tiermodell untersucht.

1.4 Das heterologe Mausmodell zur Untersuchung der Endometriose

Spontan auftretende Endometriose kommt nur beim Menschen und einigen menstruierenden nicht-humanen Primaten vor (D'Hooghe und Debrock, 2002). Ethische und praktische Erwägungen sowie die hohen Kosten der Tierexperimente an nicht-humanen Primaten haben die Wissenschaftler dazu veranlasst, eine Vielzahl von *in vivo*-Tiermodellen - hauptsächlich mit Nagetieren - zu entwickeln, um die Physiologie des humanen Endometriums und die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen der Endometrioseentwicklung zu untersuchen (Rossi et al., 2000; Fazleabas et al., 2002; Grummer, 2006). Da Nagetiere eine Endometriose nicht spontan entwickeln, wird diese unter experimentellen Bedingungen durch die Transplantation von endometrialem Gewebe in die Labortiere induziert (Story und Kennedy, 2004; Grummer, 2006). In der Endometrioseforschung werden zwei verschiedene Transplantationsmodelle angewandt. Bei den autologen Tiermodellen wird Endometriumgewebe desselben Tieres oder eines genetisch identischen Tieres verwendet. Etabliert wurde diese Methode bei Kaninchen (Dunselman et al., 1989), Hamstern (Steinleitner et al., 1991), Ratten (Vernon und Wilson, 1985) und Mäusen (Cummings und Metcalf, 1995; Rossi et al., 2000). Aufgrund geringerer Haltungskosten, einfacher Handhabung und einer guten Verfügbarkeit sind diese Labortiere in der Endometrioseforschung weit verbreitet. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die menschliche Spezies ist bei diesem Modell jedoch aufgrund der phylogenetischen und biochemischen Unterschiede des Endometriums nicht ohne weiteres möglich (Story und Kennedy, 2004). Daher wurden heterologe Tiermodelle entwickelt, bei denen humanes Endometriumgewebe in die Bauchhöhle immundefizienter Mäuse

transplantiert wurde, um der humanen Situation näher zu kommen. Immundefiziente Mäuse ermöglichen ein Persistieren des transplantierten heterologen Endometriumgewebes über einen längeren Zeitraum. Lange Zeit wurde fast ausschließlich die homozygote Nacktmausmutante (nu/nu) verwendet, welche eine angeborene Thymusaplasie besitzt. Diesen Nacktmäusen fehlt daher ein intaktes T-Zellsystem (Wortis, 1971), wohingegen das B-Zell-Abwehrsystem und die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) weiterhin aktiv sind. Zamah et al. (1984) konnten zeigen, dass humanes endometriales Gewebe erfolgreich in Nacktmäuse transplantiert werden kann und das Gewebe seine grundlegende Morphologie, seine biochemischen Eigenschaften und somit seine humanen Charakteristiken beibehält. Humanes ektopes Gewebe, das nach einiger Zeit der Kultivierung in Nacktmäusen diesen wieder entnommen wird, ähnelt morphologisch und histologisch endometriotischen Läsionen von erkrankten Frauen (Zamah et al., 1984; Bruner et al., 1997; Nisolle et al., 2000b; Grummer et al., 2001; Bruner-Tran et al., 2002). Die Erkenntnisse, die aus ausgedehnten Studien zum Effekt verschiedener pharmakologischer Substanzen auf humanes, in immundefiziente Mäuse transplantiertes Gewebe gewonnen wurden, zeigen, dass die Medikamentensensibilität nach der Transplantation erhalten bleibt (Bergqvist et al., 1985a). So kann in diesem Modell z.B. der Effekt medikamentöser Therapien auf die Genexpression und Physiologie der ektopen Fragmente näher untersucht werden (Fechner et al., 2007; Monckedieck et al., 2009). Das heterologe Endometriose-Mausmodell bietet daher eine hervorragende Möglichkeit zur Identifizierung und Testung neuer therapeutischer Strategien für die Behandlung der Endometriose. Um die Immunantwort auf das transplantierte humane Gewebe weiter zu reduzieren, wird inzwischen vermehrt mit NOD (*non-obese diabetic*)-SCID (*severe combined immunodeficiency*)-Mäusen gearbeitet, die im Unterschied zu den Nacktmäusen mehrere immunologische Defizienzen wie die funktionale Inkompetenz von T-, B- und NK-Zellen besitzen. Diese Mäuse sind deshalb ideale Kandidaten um Fremdtransplantate zu erhalten, und haben hohe Raten der Transplantatannahme (Aoki et al., 1994). Bereits zwei Tage nach der Transplantation adhären die endometrialen Fragmente und nach vier Tagen wachsen murine Blutgefäße in die ektopen Läsionen ein (Grummer et al., 2001). Endometriotische Läsionen, die in NOD-SCID-Mäusen kultiviert wurden, besitzen eine besser erhaltene Morphologie und Expression von Steroidhormonrezeptoren verglichen mit ektopen Läsionen, die in der Nacktmaus kultiviert wurden (Grummer et al., 2001). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit das heterologe NOD-SCID-Mausmodell zur Untersuchung der Wirkung

verschiedener Behandlungen auf die Induktion der Dezidualisierung sowie auf die Proliferations- und Apoptoserate in den ektopen endometrialen Läsionen verwendet.

1.5 Zielsetzung

Die zur Zeit aktuellen Behandlungen der Endometriose sind immer noch mit unerwünschten Nebenwirkungen und hohen Rezidivraten verbunden. Aus diesem Grund besteht eine Notwendigkeit spezifischere therapeutische Strategien zu entwickeln.

Da inzwischen davon ausgegangen wird, dass das endometriale Stroma eine wichtige Rolle bei der Etablierung der Endometrioseherde spielt (Nisolle et al., 2000a), könnte die terminale Differenzierung dieser stromalen Zellen zu Deziduazellen und eine in diesen Zellen ausgelöste nachfolgende Apoptose einen vielversprechender Ansatz für innovative medizinische Anwendungen bieten. Durch vorhergehende Studien anderer Arbeitsgruppen ist bekannt, dass die kombinierte Behandlung von Progestinen und cAMP die Dezidualisierung humaner endometrialer Stromazellen *in vitro* verstärken kann (Gellersen und Brosens, 2003). In der vorliegenden Arbeit wird daher untersucht, ob die Dezidualisierung auch *in vivo* in ektopen endometrialen Fragmenten in einem etablierten heterologen Endometriose-Mausmodell induziert werden kann, um somit die Persistenz der endometrialen Läsionen zu reduzieren. Um die Dezidualisierung der endometrialen Stromazellen auszulösen bzw. zu verstärken werden die Mäuse nach der Transplantation mit Progesteron alleine oder in Kombination mit den cAMP-steigernden Substanzen Forskolin oder hCG behandelt. Zusätzlich zum Progesteron soll in der vorliegenden Arbeit vergleichend der Effekt von MPA in Kombination mit hCG auf die Dezidualisierung ektopen endometrialen Gewebes untersucht werden. Die Morphologie, der Dezidualisierungsgrad, die Proliferations- und Apoptoserate des ektopen endometrialen Gewebes wird mittels verschiedener Methoden in den unterschiedlichen Behandlungsansätzen vergleichend analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Benzylbenzoat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Roth, Karlsruhe
DAB Liquid Substrat-Chromogen-System	Dako, Hamburg
Deoxycholat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DEPC	Roth, Karlsruhe
Desoxynucleotidmix (je 10 mM)	Genecraft, Köln
D-Glucose Monohydrat	Serva, Heidelberg
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe
DTT 0,1 M	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA > 99%	Roth, Karlsruhe
Eosin	Roth, Karlsruhe
Essigsäure 100%	Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid [10 mg/ml]	Serva, Heidelberg
Formaldehyd 37%	Roth, Karlsruhe
Forskolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Riedel-de Haën, Seelze
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin	Thermo-Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Ham's F-12	Biochrom, Berlin
HPLC-H ₂ O	Merck, Darmstadt
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer, NL

Isotone NaCL-Lösung (0,9%)	Braun, Melsungen
Kaliumchlorid	Riedel-de Haen, Seelze
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ketamin	Ceva, Düsseldorf
Methanol zur Analyse	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Medroxyprogesteronacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Milchpulver fettfrei	TSI, Zeven
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat ultra pure > 99%	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40	Lonza, Basel, Schweiz
Oligo(dT) ₂₀ -Starteroligonucleotide	Invitrogen, Karlsruhe
Ovogest® (humanes Choriongonadotropin)	Intervet, Boxmeer, Niederlande
Paraplast Tissue Embedding Medium (Paraffin)	Mc Cormick Scientific, St. Louis, MO, USA
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
Penicillin (10 U/ml)/Streptomycin (10 µg/ml)-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Progesteron	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protease/Phosphatase-Inhibitor Tablette	Roche, Mannheim
Rizinusöl	Apotheke, Universitätsklinikum Essen
Rotiphorese®NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40% (19:1)	Roth, Karlsruhe
Roti-Quant zur Proteinbestimmung	Roth, Karlsruhe
Salzsäure rauchend	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37%	Roth, Karlsruhe
Shandon Xylene Substitute	Thermo-Scientific, Pittsburgh, USA
Shandon Xylene Substitute Mountant	Thermo-Scientific, Pittsburgh, USA
Suprapur Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt

TEMED	Serva, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Tween®20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylazin	Ceva, Düsseldorf
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einkanal-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Einmalskalpelle	HMD Healthcare Ltd.; Hereford, UK
Einmalspritzen (1 ml)	Terumo Europe N. V., Leuven, Belgien
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Injektionskanülen (20G, 23G und 27G)	Becton Dickinson, Bedford, MA, USA
Mikrotiterplatten (ABI Prism)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Nahtmaterial (Vicryl 6/0, 5/0)	Ethicon, Norderstedt
Nitrozellulosemembran Hybond-C Extra	Amersham Biosciences, Freiburg
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 – 100 µl, 100 – 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (0,5 – 10 µl)	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Roth, Karlsruhe
Polypropylen-Reaktionsgefäße (12 ml, 15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme Super RX Fuji Medical	Fujifilm, Düsseldorf

Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)

Greiner Bio-One,
Frickenhausen

UV-Küvetten

Eppendorf, Hamburg

Whatman 3MM-Papier

Biometra, Göttingen

2.1.3 Laborgeräte

Agarose-Gelelektrophoresekammer

Selbstbau Medizintechnik

Universitätsklinikum Essen

Analysenwaage Precisa 4000c

Söntgen, Bottrop-Kirchhellen

Axiophot Fluoreszenzmikroskop

Zeiss, Oberkochen

Blockthermostat BT 1301

HLC Bio Tech, Bovenden

Brutschrank Hera Cell 240i

Thermo Fisher Scientific,
Langenselbold

Feinwaage ALJ 220-4NM

Kern, Balingen

Geldokumentationssystem Herolab SU-1

Herolab Laborgeräte, Wiesloch

Homogenisator Polytron PT3100

Kinematica, Littau-Lucerne,
Schweiz

Kühlzentrifuge Biofuge 28RS

Heraeus, Hanau

Laborwippe 3013

GFL, Burgwedel

Magnetrührer IKAMAG®

IKA®-Werke, Staufen

Paraffinausgießstation PA/3,3

Chirurgie & Elektromechnik,
Ludwigslust

PCR-Maschine T3 Thermocycler

Biometra, Göttingen

pH-Meter HI 9025

Hanna Instruments, Kehl am
Rhein

Photometer BioPhotometer plus

Eppendorf, Hamburg

Pipettierhilfe pipetus®

Hirschmann Laborgeräte,
Eberstadt

Proteintransferkammer

Bio-Rad, München

RealTime PCR-Maschine ABI Prism 7300

Applied Biosystems,
Weiterstadt

Mikrotom 2050 Supercut Reichert-Jung

Leica, Wetzlar

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Spannungsgerät PHERO-stab. 500	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Spannungsgerät	Bio-Rad, München
Stereomikroskop Stemi DV4	Zeiss, Oberkochen
Sterilbank Class II	Nuaire, Plymouth, USA
Taumelschüttler Rotamax 120	Heidolph, Schwabach
Ultraschallprozessor (GE 50)	Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA
Vortexer L46	GLW, Würzburg
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotina 38R	Hettich, Tuttlingen

Alle verwendeten Geräte und Materialien bzw. Chemikalien entsprachen dem allgemeinen Laborstandard und wurden in Analysequalität von den oben aufgeführten Firmen bezogen.

2.1.4 Enzyme

DNase I [1 U/μl] u. Puffer (Molekularbiologie)	Invitrogen, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase [200 U/μl] u. Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase BioTherm™ [5 U/μl] u. Puffer	Genecraft, Köln

2.1.5 Molekularbiologische und proteinbiochemische Kits

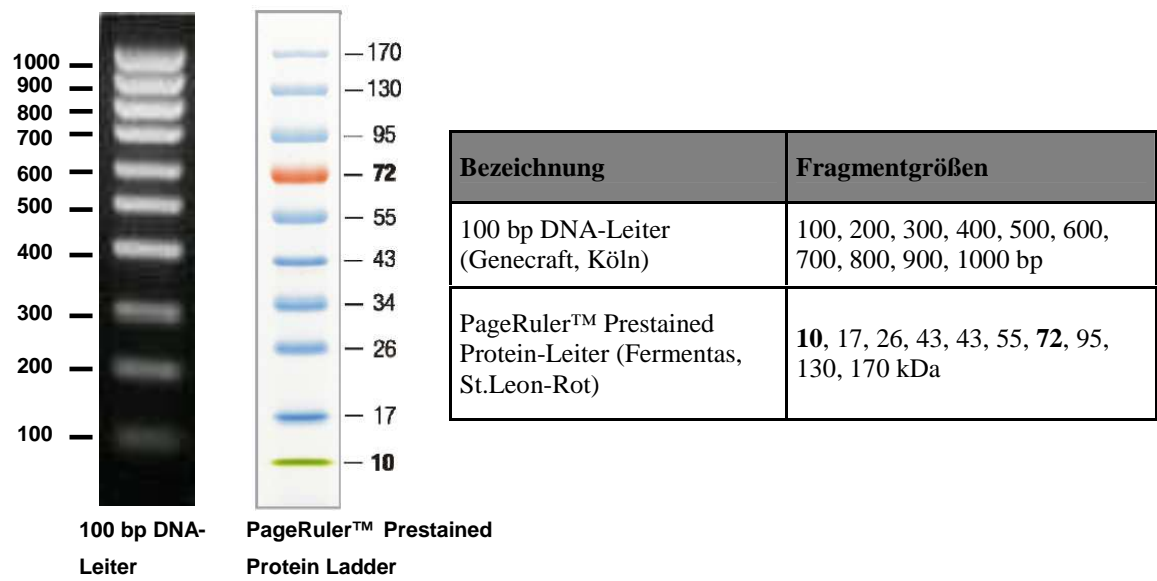
E.Z.N.A. GelExtraction Kit (V-spin)	Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA
E.Z.N.A. Total RNA Midi Kit	Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
Supersignal West Dura Extended Duration-Substrat	Thermo-Scientific, Pittsburgh, PA, USA

2.1.6 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Lösungen mit A. bidest angesetzt.

10×SDS-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8.8; 95 mM Glycin, 0.1% SDS (w/v)
10×Transferpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8-10.5; 192 mM Glycin
10×TBS-Puffer	20 mM Tris, 137 mM NaCl pH 7.6
TBS-T	1×TBS-Puffer, 0.15% 10%-iges Tween
Blotting-Puffer	10% (v/v) Methanol, 10% (v/v) 10×Transferpuffer
SDS-Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8.8, 0.4% SDS
SDS-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris pH 6.8, 0.4% SDS
Moscona	140 mM NaCl, 4 mM KCl, 0.4 mM NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O, 0,2 mM KH ₂ PO ₄ , 12 mM NaHCO ₃ , 9 mM D-Glucose×H ₂ O, pH 7.4
PBS/BSA	0.5-1 % (w/v) BSA (Fraktion V) in 1×PBS gelöst, pH 7.5
RIPA-Puffer	150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.2, 0.1% SDS, 1% Triton X- 100, 1% Deoxycholate, 5 mM EDTA, 1 Cocktailtablette (EDTA free Complete Proteinase Inhibitoren)
Ponceau-Lösung	0.5% (w/v) Ponceau S, 1% (v/v) Essigsäure
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris/HCL pH 6,7, 100 mM β-Mercaptoethanol, 2% SDS
10× DNA-Ladepuffer	50% (v/v) Glycerin, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 75 mM EDTA
4× SDS-Probenpuffer	20% (v/v) 1 M Tris/HCl, 27,7 μM SDS, 0,6 μM Bromphenolblau, 40% (v/v) Glycerin, 20% (v/v) β- Mercaptoethanol, 20% (v/v) A. bidest
TBE-Puffer	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA
Endometrium-Nährmedium	49,5% (v/v) DMEM, 49,5% (v/v) Ham's F12, 1% (v/v) Pen/Strep
Xylazin-Ketamin-Lösung	80% (v/v) 0,9%-ige NaCL-Lösung, 16% (v/v) 10%-ige Ketaminlösung, 4% (v/v) Xylazin
Citratpuffer	1,8 mM Zitronensäure, 8,2 mM Natriumcitrat

2.1.7 bp-Längenstandards/Molekulargewichtsstandards



2.1.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden mit dem Programm Primer Selection Tools entworfen. Die Überprüfung der Spezifität der ausgewählten Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Sequenzvergleichsprogramms BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) in der EMBL (European Molecular Biology Laboratory)-Datenbank. Die Synthese wurde anschließend bei der Firma Invitrogen in Auftrag gegeben und die erhaltenen Oligonukleotide mit HPLC-H₂O auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt.

Primer-bezeichnung	Accession number	Sequenz (5' → 3')	Position	Fragmentgröße (bp)
FOXO1-F FOXO1-R	NM002015.3	GACAGCCCTGGATCACAGTT AGATGGCGGGTACACCATAG	1241-1260 1419-1438	198
IGFBP1-F IGFBP1-R	NM000596.2	CTATGATGGCTCGAAGGCTC TTCTTGTTGCAGTTTGGCAG	764-783 900-919	156
GJA1-F GJA1-R	NM000165.3	TGGATTCAGCTTGAGTGCTG GATATTCAAGGCCAGGGACA	781-800 906-925	145
dPRL-F dPRL-R	NM000948.4	CATCAACAGCTGCCACACTT CGTTTGGTTTGCTCCTCAAT	437-456 630-649	213
ACTB-F ACTB-R	NM001101.3	AGCACAGAGCCTGGCCTTTGCC CACATGCCGGAGCCGTTGTCGA	27-48 113-134	108

2.1.9 Antikörper

Primäre Antikörper	Klonalität	Verdünnung	Applikation	Hersteller
Kaninchen anti humanes Connexin43	polyklonal	1:2000;	WB; IHC	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Maus anti humanes GAPDH	monoklonal	1:1000	WB	Millipore, Billerica, MA, USA
Kaninchen anti humanes FOXO1	polyklonal	1:50	IHC	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Maus anti humanes KAI-1	monoklonal	1:50	IHC	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Maus anti humanes CD82	monoklonal	1:5000	WB	Diaclone, Besançon, Frankreich
Kaninchen anti-humanes Caspase 3 (cleaved)	polyklonal	1:200	IHC	Zytomed, Carlsbad, CA, USA
Maus anti humanes Prolaktin	monoklonal	1:25	IHC	Zytomed, Carlsbad, CA, USA
Maus anti humanes Ki-67	monoklonal	1:400	IHC	Dako, Hamburg

Sekundäre Antikörper	Klonalität	Verdünnung	Applikation	Hersteller
Ziege anti Kaninchen IgG-HRP	polyklonal	1:10.000	WB	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg
Ziege anti Maus IgG-HRP	polyklonal	1:10.000	WB	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg
Esel anti Maus IgG (biotinyliert)	polyklonal	1:100	IHC	Dako, Hamburg
Esel anti Kaninchen IgG (biotinyliert)	polyklonal	1:200	IHC	Dako, Hamburg

2.1.10 Software und Datenbanken

ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, Weiterstadt)

SPSS Software, Version 16.0

TINA 2.09g (raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt)

NIS-Elements BR (Basic Research) Imaging Software Version 2.30 (Nikon)

GraphPad Prism 4

BLAST

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

Primer Selection Tools

<http://biotools.umassmed.edu>

2.2 Methoden

2.2.1 Humanes Endometriumgewebe

Für die vorliegende Arbeit wurde endometriales Gewebe von 16 prämenopausalen Patientinnen im Alter zwischen 30 und 50 Jahren verwendet, welches im Rahmen von Hysteroskopien in der gynäkologischen Abteilung des Universitätsklinikums Essen (Leitung: Prof. Dr. Kimmig) gewonnen wurde. Die Hysteroskopien und diagnostischen Kürettagen wurden aufgrund benigner Indikationen wie z.B. Uterus myomatosus oder zur Abklärung von Subfertilität durchgeführt. Die Gewebeentnahme sowie die anschließende Verwendung zu Forschungszwecken erfolgten mit Einverständnis der Patientinnen. Informationen zur allgemeinen Anamnese und vorherigen Behandlungen wurden den Patientenakten entnommen. Ein Ausschlusskriterium für die Verwendung des endometrialen Gewebes war die Einnahme hormoneller Präparate in den letzten 3 Monaten vor Gewebeentnahme. Zusätzlich zur Anamnese wurde histologisch nach den Kriterien von Noyes (1950) eine Zyklusbestimmung durchgeführt. Deziduagewebe aus reifen Plazenten wurde ebenfalls von der gynäkologischen Klinik des Universitätsklinikums Essen zur Verfügung gestellt.

Unmittelbar nach der Entnahme wurde das endometriale Gewebe in 4°C kalte Mosconalösung überführt. Das Gewebe wurde im Labor des Institutes für Molekularbiologie an Sterilbänken mit laminarem Luftstrom in 1,5 mm große Fragmente geschnitten. 1-2 Fragmente wurden jeweils zur späteren RNA- und Proteinextraktion in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur histologischen Analyse wurde zusätzlich 1 Fragment in 4% Formalin fixiert. Die übrigen Fragmente wurden bis zur Transplantation in Endometrium-Nährmedium bei 37°C unter 5% CO₂ Partialdruck in einer wassergesättigten Atmosphäre inkubiert. Die Transplantation der endometrialen Gewebestücke in immundefiziente Mäuse erfolgte spätestens 3 Stunden nach Gewebeentnahme.

2.2.2 Tierexperimentelle Arbeiten

2.2.2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche zyklische NOD-SCID-Mäuse aus der Zucht des Zentralen Tierlabors des Universitätsklinikums Essen (Leitung: Priv.-Doz. Dr. Hilken) eingesetzt. Die Mäuse wurden unter kontrollierten Bedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit) in einer pathogenfreien Umgebung mit reguliertem Licht/Dunkel Zyklus (12h/12h) gehalten und hatten unbegrenzten Zugang zu Nahrung und Wasser. Es fanden ausschließlich den Richtlinien entsprechende autoklavierte Käfige mit Filterhauben Verwendung. Bei Versuchsbeginn hatten die Tiere ein Alter von 2 bis 6 Monaten, wobei alle Tiere eines Versuchsansatzes in etwa das gleiche Alter aufwiesen (+/- 2 Wochen). Die Tierversuche wurden nach § 15 des Tierschutzgesetzes genehmigt (LANUV AZ 50.05-230-83/04 und AZ 87-51.04.2010.A034).

2.2.2.2 Transplantation des endometrialen Gewebes

Die vorbereiteten Endometriumfragmente wurden mittels Laparatomie in die immundefizienten Mäuse transplantiert, welche zuvor durch intraperitoneale Injektion von 160 µl einer Mischung aus NaCL, Xylazin und Ketamin (20:1:4) betäubt wurden. Pro Maus wurden vier Fragmente in einer Schlinge aus Nahtmaterial (Vicryl, 6/0) am parietalen Peritoneum der Bauchwand angenäht ohne unnötige Reizungen und Verletzungen zu verursachen. Die Bauchwand und die Haut wurden mit Einzelknopfnähten (Vicryl, 5/0) wieder verschlossen. Zusätzlich wurde die Wunde mit Aluminiumklammern zusammengehalten und täglich kontrolliert.

Da das Endometriumgewebe unterschiedlicher Patientinnen eine hohe interindividuelle Schwankung in der Reaktion auf Hormonbehandlungen zeigen kann, wurde für jeden Versuchsansatz das Gewebe derselben Patientin in verschiedene Mäuse transplantiert. Je nach Versuchsansatz handelte es sich dabei um 2 bis 4 Mäuse.

2.2.2.3 Substanzapplikationen

Als Gestagene wurden Progesteron und Medroxyprogesteronacetat (MPA) verwendet, welche in Benylbenzoat gelöst und in einer Konzentration von 50 µg subkutan (s.c.) in einem Volumen von 100 µl Benzylbenzoat:Rizinusöl (1:4) appliziert wurden. Um den intrazellulären cAMP-Spiegel zu erhöhen, wurden zwei verschiedene Substanzen eingesetzt: Zum einen das Diterpenoid Forskolin, ein Adenylatzyklaseaktivator, und zum anderen humanes Choriongonadotropin (hCG), welches hauptsächlich über den cAMP/Proteinkinase A (PKA)-Signalweg wirkt (Tang und Gurbide, 1993; Maruyama und Yoshimura, 2008). Forskolin wurde in DMSO gelöst und jeweils 100 µg intraperitoneal (i.p.) in einem Volumen von 100 µl DMSO:NaCl (1:4) appliziert. Humanes CG wurde in einer Konzentration von 7,5 IU gelöst in 100 µl NaCl i.p. injiziert. Pro Versuchsreihe diente eine Maus als Vehikelkontrolle, welcher nur das jeweilige Lösungsmittel appliziert wurde. Am Ende der jeweiligen Versuchsreihen wurden die endometrialen Gewebefragmente entnommen und wie unter 2.2.2.4 beschrieben aufgearbeitet.

2.2.2.4 Entnahme der transplantierten Fragmente

Nach Beendigung der jeweiligen Versuchsansätze wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und gewogen. Das Fell im Bereich des Bauchraums wurde mit 70%-igem Ethanol sterilisiert und mit einer Schere angeschnitten. Das Fell wurde rostrokaudal abgezogen. Nach Lokalisation der transplantierten Fragmente anhand der Fixierungsnähte wurde die Bauchhöhle beginnend in der Bauchmitte eröffnet. Unter einem Stereomikroskop wurden die Fragmente zunächst vermessen und anschließend aus dem murinen Gewebe präpariert. Das Gewicht der Fragmente wurde mit einer Feinwaage ermittelt. Zur RNA- und Proteinextraktion wurden jeweils 3 Fragmente pro Maus getrennt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Je 1 Fragment wurde zur histologischen Analyse über Nacht in 4% Formalin fixiert.

Zur Überprüfung der Auswirkungen der Substanzapplikation auf den Organismus der Maus wurde zusätzlich der Uterus präpariert. Der Uterus wurde möglichst nahe am Übergang zum Eileiter gehalten und mit einer Schere vom Mesometrium getrennt. Der freigelegte Uterus wurde an den beiden Eileitern und am unteren Ende des Cervix uteri

abgetrennt. Das Uterusgewicht wurde bestimmt und als prozentualer Anteil des Körpergewichtes dargestellt.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Die endometrialen Fragmente wurden jeweils in 50 ml Reaktionsgefäße, in denen 2 ml Lysispuffer und 40 µl β-Mercaptoethanol vorgelegt wurden, überführt und mit einem Homogenisator bei 16.000 - 17.000 UpM aufgeschlossen. Der Homogenisatorstab wurde zuvor für 10 min mit 0,1 M NaOH behandelt und anschließend gründlich mit DEPC-H₂O gewaschen. Diethylpyrocarbonat (DEPC) modifiziert Histidinreste in Proteinen zu N-Carbethoxyhistidin und führt dadurch u.a. zur Hemmung von Enzymen wie RNasen. Zwischen der Aufarbeitung der verschiedenen Fragmentproben wurde der Homogenisatorstab ebenfalls mit DEPC-H₂O gewaschen. Die Isolierung von RNA aus dem homogenisierten Gewebe wurde mit dem „E.Z.N.A. Total RNA Midi Kit“ der Firma Omega Bio-Tek nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde über eine Säule die RNA aufgereinigt und schließlich in 150 µl DEPC-H₂O eluiert. Vor der Lagerung bei -80°C wurde die Konzentration der RNA bestimmt (siehe 2.2.3.2).

2.2.3.2 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und die Reinheit von Nukleinsäurelösungen können mit Hilfe eines Photometers anhand der Absorption von UV-Licht bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum der heterozyklischen Nukleinsäuren liegt bei 260 nm und das der aromatischen Aminosäurereste bei 280 nm. Daher wurde die Absorption bei diesen beiden Wellenlängen gemessen. Als Leerwert diente das jeweils eingesetzte Lösungsmittel. Ein Absorptionswert von 1,0 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml bei einzelsträngiger DNA oder RNA. Um den Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung zu bestimmen, wird der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm gebildet. Bei DNA-Lösungen zeigt ein Koeffizient zwischen 1,8 und 2,0 eine reine Probe an, bei RNA-Lösungen ein Koeffizient zwischen 1,9

und 2,2. Geringere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit UV-absorbierenden Stoffen wie z.B. Proteinen hin. Alle verwendeten Proben entsprachen diesen Reinheitskriterien.

2.2.3.3 Reverse Transkription (RT)

Vor der Reversen Transkription wurde zunächst ein DNase-Verdau durchgeführt, um eventuell noch in den Proben enthaltene DNA abzubauen. Hierfür wurden 2 µg RNA mit 2 µl 10× DNase-Puffer und 1 µl DNase I (Invitrogen) versetzt, mit DEPC-H₂O auf 20 µl aufgefüllt und für 15 min bei RT inkubiert. Um die DNase zu inaktivieren, wurden die RNA-Proben im vorgeheizten Thermocycler für 10 min bei 65°C inkubiert. Danach wurden die Proben auf 8°C gekühlt. Nach diesem ersten Schritt erfolgte die Reverse Transkription mit dem M-MLV-RT-System der Firma Invitrogen. Dazu wurden auf die Proben 30 µl eines vorher angefertigten Reagenziengemisches gegeben, bestehend aus 10 µl 5× Puffer, 2,5 µl dNTPs [10 mM], 4 µl DTT, 1 µl oligo(dT)₂₀-Primer, 1 µl M-MLV RT [200 U/µl] und 11,5 µl DEPC-H₂O. Die Oligo(dT)₂₀-Primer, die sich an den Poly-A-Schwanz der mRNAs anlagern, dienten dabei als Startpunkt für die Reverse Transkriptase. Die Umschreibung in die cDNA erfolgte für 1 h bei 37°C. Der Ansatz wurde anschließend für 5 min auf 95°C erhitzt, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren und die Proben daraufhin auf 8°C gekühlt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei - 20°C. Die cDNA konnte nun als Ausgangsmaterial für die folgenden PCR-Reaktionen dienen.

2.2.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Methode wurde eingesetzt, um die Funktionalität der Primer zu überprüfen und mögliche Kreuzreaktionen der Oligonukleotide mit murinen Sequenzen auszuschließen. Zu diesem Zweck wurden die Primer an cDNA aus murinem Uterus-, humanem Endometrium- und humanem Deziduagewebe getestet. Zusätzlich wurden semiquantitative PCRs zur Amplifikation spezifischer cDNA-Sequenzen in RT-Ansätzen zur Herstellung von Standardreihen für die quantitative Echtzeit-PCR durchgeführt. Der durch die reverse Transkription synthetisierte cDNA-Strang (s. 2.2.3.3) dient dabei als Matrize für die Amplifikation eines spezifischen cDNA-Abschnittes. Dazu wurden 4 µl des reversen Transkriptionsansatzes (s. 2.2.3.3) mit genspezifischen Primern in der PCR eingesetzt.

PCR-Ansatz:

4 µl	RT-Ansatz
5 µl	10×-Puffer
1 µl	dNTPs
1 µl	Primer -F, -R [25 pmol/µl]
0,5 µl	Taq-Polymerase [5U/µl]
ad 50 µl	H ₂ O

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen im Thermocycler durchgeführt:

Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
94	2 min	1
94	45 sec	35
60	45 sec	
72	2 min	
72	5 min	1

2.2.3.5 Agarosegelelektrophorese

Nach Beendigung der PCR wurde die Größe des amplifizierten Produkts in einer Gelelektrophorese kontrolliert. Für eine optimale Fragment-Auftrennung wird die Agarosekonzentration des Gels auf die Länge der zu trennenden Nukleinsäuren abgestimmt. Aufgrund der Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente wurden 2%-ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde mit 1×TBE-Puffer versetzt und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst, mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 mg/ml) zum Anfärben der DNA versetzt und in einen Gelträger mit einem entsprechend gewählten Kamm gegossen. Das erhärtete Gel wurde in die Elektrophoresekammer gelegt, mit 1× TBE-Puffer überschichtet und der Gelkamm entfernt. Die Proben wurden mit 10× DNA-Ladepuffer versetzt und anschließend in die Taschen des Agarosegels geladen. Als Größenstandard wurden 10 µl einer 100 bp DNA-Standard-Leiter aufgetragen, um später die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können. Die elektrophoretische Trennung der DNA-Fragmente erfolgte für ca. 1 h bei 120 V. Eine Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse wurde unter UV-Licht (312 nm) an dem Geldokumentationssystem Herolab SU-1 vorgenommen.

2.2.3.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung der DNA aus Agarosegelen wurde das „E.Z.N.A. GelExtraction Kit“ der Firma Omega Bio-Tek verwendet. Die gewünschte Bande wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in Bindepuffer gelöst. Anschließend wurde die DNA/Agarose-Lösung auf eine HiBind® Spinsäule aufgetragen und die cDNA nach drei Waschschritten mit 40 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert. Die Konzentration und Reinheit der cDNA-Lösung wurde gemessen (siehe 2.2.3.2) und zur Herstellung von Standardreihen für die quantitative Echtzeit-PCR verwendet.

2.2.3.7 Quantitative Echtzeit-PCR

Mit der Echtzeit-PCR ist es möglich, mRNA aus Zellen oder Geweben indirekt zu quantifizieren. Dafür wurde die mRNA durch eine Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (s. 2.2.3.3) und mit dieser eine Echtzeit-PCR (ABI Prism 7300 Sequence Detection System) durchgeführt. Zur quantitativen Bestimmung der Expressionswerte wurden Standardkurven der spezifischen Produkte und des Haushaltsgens *ACTB* in einer Echtzeit-PCR erstellt. Dazu wurden die cDNA-Lösungen aus der Aufreinigung aus Agarosegelen (s. 2.2.3.6) auf eine Konzentration von 1 ng/µl eingestellt und jeweils eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 100 pg/µl, 10 pg/µl, 1 pg/µl, 100 fg/µl, 10 fg/µl, 1 fg/µl, 0,1 fg/µl angesetzt. Diese Standardreihen wurden zunächst in einer Echtzeit-PCR getestet. Zur Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR wurde ein Gemisch aus allen benötigten Komponenten mit Ausnahme der cDNA angesetzt und jeweils 19 µl in die Vertiefungen einer 96er-Lochplatte pipettiert. Anschließend wurde 1 µl der cDNA (s. 2.2.3.3) der zu untersuchenden Proben zu den vorgelegten 19 µl gegeben. Jede Probe wurde in einem dreifachen Ansatz amplifiziert.

Echtzeit-PCR-Ansatz:

10 µl	Power SYBR® Green I PCR Master Mix
0,15 µl	Primer -F, -R [25 pmol/µl]
1 µl	RT-Ansatz
8,7 µl	H ₂ O

Dem Reaktionsansatz ist der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I zugesetzt, der mit doppelsträngiger DNA einen charakteristisch fluoreszierenden Komplex bildet. Bei jedem Zyklus der PCR lässt sich daher die Fluoreszenz als Maß für die Produktentstehung verfolgen. Die Bedingungen zur Durchführung der PCR sind in der unten stehenden Tabelle dargestellt und werden im Text näher erläutert.

Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
50	2 min	1
95	10 min	1
95	15 sec	45
60	1 min	
95	15 sec	1
60	30 sec	1
95	15 sec	1

Nach zweiminütiger Erhitzung der Proben bei 50°C folgte die Aktivierung der AmphiTaqGold® DNA-Polymerase für 10 Minuten bei 95°C. Eine Erhitzung für 15 sec bei 95°C und eine 1minütige Inkubation bei 60°C wurden 45× wiederholt. Abschließend wurden für die Ermittlung der Dissoziationskurve die Proben in 0,1°C Schritten von 60°C auf 95°C erhitzt. Durch das Aufschmelzen der DNA-Stränge wurden die interkalierten SYBR® Green I-Moleküle freigesetzt und die Abnahme der Fluoreszenz gemessen. Unspezifisch entstandene Produkte lassen sich damit detektieren. Zusätzlich wurde die Spezifität bei einer anschließenden Auftrennung der Echtzeit-PCR-Proben in einem 2% Agarosegel überprüft. Die Daten über den Anstieg der Fluoreszenz bei der PCR-Reaktion geben anhand der jeweils gleichzeitig ermittelten Standardkurven Aufschluss über die Ausgangsmenge der amplifizierten Sequenz. Die Anzahl der Temperaturzyklen (C_t -Wert) wurde bestimmt, ab der die Fluoreszenz einen fixen Wert innerhalb der exponentiellen Phase der Reaktion erreichte. Je höher der C_t -Wert ist, also je mehr Zyklen notwendig sind, um den einer bestimmten Produktmenge entsprechenden Fluoreszenzwert zu erreichen, desto geringer war die Ausgangsmenge der amplifizierten DNA. Die unterschiedliche Syntheserate bei der Reversen Transkription wurde durch einen externen Standard normalisiert. Als Standard wurde das Haushaltsgen *ACTB* gewählt. Aufgrund der großen interindividuellen Unterschiede des Ausgangsgewebes wurde die relative Expression der untersuchten Gene im Vehikeltier gleich 1 gesetzt und die x-fache Expression im Substanz behandelten Tier entsprechend bestimmt, um auf diese Weise den Effekt der verwendeten

Substanzen bestimmen zu können. Die Auswertung wurde mit dem Programm Excel durchgeführt.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Proteinextraktion aus Gewebe

Zur Proteinextraktion wurden die Gewebefragmente in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, in denen 200 µl RIPA-Puffer vorgelegt wurde. Eine Proteaseinhibitortablette wurde immer frisch zu dem RIPA-Puffer zugegeben. Mittels eines Ultraschallstabes (2× 30 sec, mittlere Stufe) wurden die Zellen weitgehend aufgeschlossen. Die Proben wurden während der Ultraschallbehandlung auf Eis gekühlt, um ein starkes Erhitzen zu verhindern. Um die Zellen vollständig aufzuschließen, wurde das Lysat anschließend mehrfach mit einer Injektionskanüle (20G) aufgezogen. Die homogene Suspension wurde für 30 min auf Eis gestellt und anschließend für 10 min bei 4°C und 13.000 UpM zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und ein Aliquot zur Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzt.

2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) mit der den Farbstoff CBBG250 („Coomassie Brilliantblau-G250“) enthaltenden Roti-Quant-Lösung. Dazu wurden 2 µl der Proteinlösung zu 798 µl A. bidest pipettiert. Die Lösung wurde gemischt, mit 200 µl Roti-Quant-Lösung versetzt (1:500 Verdünnung), mit dem Vortexer gemischt und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Für den Leerwert wurden 800 µl A. bidest mit 200 µl Roti-Quant-Lösung gemischt und ebenfalls für 10 min im Dunkeln inkubiert. Zuvor wurde unter Verwendung von BSA-Lösungen bekannter Konzentration eine Eichkurve erstellt. Die optische Dichte der Proteinlösungen wurde mit einem Photometer bei 595 nm gemessen und anhand der vorher ermittelten Eichkurve die jeweilige Proteinkonzentration der Proben bestimmt. Dieser Schritt ermöglichte die Auftragung gleicher Mengen an Protein in der nachfolgenden SDS-PAGE, um ein vergleichbares Ergebnis zu erhalten.

2.2.4.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts wurde die denaturierende diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt.

Es wurden 12%-ige Trenngele und 4%-ige Sammelgele verwendet. Die Gele wurden mit dem BioRad Gelgießsystem nach den unten angegebenen Zusammensetzungen gegossen.

Reagenzien	Trenngel 12%	Sammelgel 4%
H ₂ O	2,2 ml	1,625 ml
SDS-Trenngelpuffer	1,25 ml	-
SDS-Sammelgelpuffer	-	0,625 ml
Acrylamid/Bis-Lösung	1,5 ml	0,267 ml
10 % APS	50 µl	7,5 µl
TEMED	1,25 µl	2,5 µl

Von jeder Probe wurden 10 µg Protein im Verhältnis 1:4 mit reduzierendem 4× SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C aufgeköcht, auf Eis abgekühlt und danach in die Taschen der Gele gefüllt. Zusätzlich wurde eine Tasche mit 6 µl des Größenstandards beladen. Eine Ausnahme bildete die Detektion von CD82. Um diese mit dem angegebenen Antikörper zu ermöglichen, wurde die SDS-PAGE mit 30 µg Protein unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

Die Elektrophorese erfolgte im Sammelgel zur Fokussierung der Proteine bei einer Spannung von 70 V. Erreichte die Lauffront das Trenngel, wurde die Stromspannung erst auf 120 V, dann auf 150 V erhöht. Die Elektrophorese erfolgte bis zum Auslaufen der Bromphenolblaufront (ca. 1,5 h - 2 h).

2.2.4.4 Western Blot

In dieser Arbeit erfolgte der elektrophoretische Transfer der zuvor in der SDS-PAGE separierten Proteine auf eine proteinbindende Trägermembran aus Nitrozellulose mit dem Nass-Blot-System von BioRad. Zunächst wurden zwei Lagen Vlies, vier zurechtgeschnittene Whatman-Papiere und die Nitrozellulose-Membran in 1×Blotting-Puffer getränkt. Die

Blotkammer wurde wie folgt - ausgehend von der Kathode - luftblasenfrei zusammengebaut: Auf ein Vlies wurden zwei Lagen Whatman-Papier, das SDS-Trenngel, die Nitrozellulose-Membran, erneut zwei Lagen Whatman-Papier und ein weiteres Vlies übereinander geschichtet. Der komplette Sandwich-Aufbau wurde zwischen zwei Gitter gepresst, verriegelt und in die dafür vorgesehenen Halteschienen eingeführt. In die Nass-Blot-Apparatur wurde ein Kühlaggregat eingesetzt und ein Rührfisch wurde hinzugefügt. Nachdem der vorgekühlte Blotting-Puffer in die Kammer eingefüllt wurde, erfolgte das Blotten für zwei Stunden bei RT bei einer Stromstärke von 70 mA von der Kathode zur Anode. Um eine gleichmäßige Wärmeverteilung zu garantieren, wurde während des Blottens langsam gerührt. Nach dem Blotten wurde das Sandwich demontiert und der Blot mit der Proteinseite nach oben kurz in TBS-T gewaschen.

2.2.4.5 Proteinfärbung auf der Nitrozellulosemembran

Um den erfolgreichen Proteintransfer zu überprüfen, erfolgte ein erster reversibler visueller Nachweis der Proteinbanden auf der Nitrozellulosemembran mit einer Ponceau-Rot-Färbung. Die Proteinnachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei 100 ng Protein pro Bande. Diese Färbemethode zeigt, ob das Protein gleichmäßig in die unterschiedlichen Taschen des SDS-Gels geladen wurde. Hierzu wurde die Membran solange in der Färbelösung inkubiert, bis rote Banden sichtbar wurden. Der überschüssige Farbstoff wurde mit H₂O von der Membran gewaschen und die Membranen zur Dokumentation eingescannt. Durch Zugabe von TBS-T kann die Membran wieder entfärbt werden.

2.2.4.6 Immundetektion von Proteinen auf der Nitrozellulosemembran

Auf der Membran lassen sich die transferierten Proteine mit geeigneten Antikörpern nachweisen. Die hier verwendeten Antikörper sind unter 2.1.9 aufgeführt. Vor der Antikörperreaktion wurden die restlichen freien Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran für 1 h bei RT mit einer Lösung aus 10% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T blockiert. Die anschließende Inkubation mit dem in 2% (w/v) Magermilchpulver oder 5% BSA (w/v) (CD82) in TBS-T verdünnten Primärantikörper erfolgte üN bei 4°C. Vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die ungebundenen restlichen

Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt (2×5 min, 1×15 min). Es folgte eine 60minütige Inkubation bei RT mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Durch diesen sekundären Antikörper kann der Komplex aus primärem Antikörper und Protein wie unter 2.2.4.7 beschrieben sichtbar gemacht werden. Die Membran wurde daraufhin zweimal für 10 min gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen, und konnte anschließend zum Chemilumineszenz-Nachweis eingesetzt werden.

2.2.4.7 Chemilumineszenz-Nachweis (ECL-Reaktion)

Der Nachweis der Chemilumineszenzreaktion erfolgte nach Towbin und Gordon (1984) unter Verwendung des ECL-Systems der Firma Thermo-Scientific gemäß Herstellerangaben. Durch Auflegen eines Röntgenfilms auf den mit der ECL-Lösung behandelten Blot kommt es nach Entwicklung des Röntgenfilms zu einer Schwärzung des Films an den belichteten Stellen. Der Film wurde je nach Antikörper unterschiedlich lange belichtet. Die Intensität der so entstandenen Banden gibt Aufschluss über die relative Menge des Proteins. Die jeweilige spezifische Proteinexpression wurde durch die GAPDH-Expression normalisiert. Die Höhe der Banden wurde mit einem in der SDS-PAGE mitgeführten Standard verglichen, der eine Aussage über das Molekulargewicht der Bande auf dem Röntgenfilm erlaubt. Nach Scannen des entwickelten, belichteten Röntgenfilms konnten relative Veränderungen zwischen untersuchten Proben quantitativ erfasst werden. Die densitometrischen Analysen der Proteinbanden erfolgten durch das Programm TINA 2.09g.

2.2.5 Morphologische Methoden

2.2.5.1 Histologische Analyse

Zur morphologischen Untersuchung wurden die endometrialen Fragmente in Paraffin eingebettet. Dazu wurde als erstes das präparierte Endometriumgewebe zunächst in 4% Formalin fixiert. Nach der Fixierung wurde das Fixierungsmittel ausgewaschen und das Gewebe durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Über das Intermediärmedium Xylol wurde das Gewebe in 60°C flüssiges Paraffin eingebracht und nach Durchdringung

in Paraffin eingebettet und abgekühlt. Das Gewebe im Paraffinblock wurde auf einem Mikrotom in eine Schichtdicke von 7 µm geschnitten und jeweils 3 Schnitte auf einen Objektträger gebracht. Bei jedem fünften Objektträger wurden die Gewebeschnitte mittels Hämatoxylin-Eosin (s. 2.2.5.2) angefärbt, um den endometrialen Charakter der makroskopisch erkannten Läsionen zu bestätigen (Noci et al., 1995), die durchschnittliche dezidualisierte Arealgröße zu bestimmen und geeignete Schnitte für die immunhistochemischen Färbungen herauszusuchen. Die Auswertung und morphologischen Analysen der HE- und immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte erfolgte am Axiophot Mikroskop mit Hilfe der NIS-Elements BR Software.

2.2.5.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Als Vorbereitung auf die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und dann über eine absteigende Alkoholreihe schrittweise wieder hydriert. Nach Spülen in Leitungswasser und A. bidest wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gefärbt. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der in Form des basischen Hämalan alle sauren Gewebebestandteile wie Nukleinsäuren intensiv blau färbt. Ungebundenes Hämatoxylin wurde mit warmem Leitungswasser abgewaschen. Als nächster Schritt wurde mit Eosin gefärbt. Bei Eosin handelt es sich um einen sauren synthetischen Farbstoff, der basische Zellstrukturen rot anfärbt. Dazu gehören vor allem die Proteine des Zytoplasmas. Auch hier wurde ungebundener Farbstoff abgewaschen. Nach den Färbungen wurden die Schnitte wieder durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und daraufhin mit einem Xylen-Substitut behandelt. Nun konnten die Schnitte mit Shandon Xylene Substitute Mountant eingedeckt werden.

2.2.5.3 Immunhistochemische Analyse

Die immunhistochemische Analyse ermöglicht den Nachweis eines Proteins mit Hilfe von Antikörpern an Gewebeschnitten. Zu diesem Zweck wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert, über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert und für 5 min mit PBS gewaschen. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte anschließend für 20 min in 10 mM Natriumcitratpuffer (pH 6) gekocht. Nach ca. 10minütigem Abkühlen der Schnitte

wurden diese erneut für 20 min in PBS gewaschen. Jeder Schnitt wurde mit einem hydrophoben Markierungstift (Dako, Hamburg) umkreist und im Weiteren ein Volumen von 20 µl aller verwendeten Lösungen direkt auf die Schnitte aufgetragen. Um eine endogene Peroxidase-Aktivität zu blockieren, wurden die Schnitte für 10 min in einer Wasserstoffperoxid-Lösung (1:40 in Methanol verdünnt) unter Lichtschutz inkubiert. Freie Bindungsstellen wurden danach für 20 min mit 0,5%-igem BSA in PBS abgesättigt. Der primäre und sekundäre Antikörper wurde - wie unter 2.1.9 angegeben - in PBS/BSA verdünnt. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte üN bei 4°C. Die ungebundenen Antikörper wurden anschließend durch Waschen mit PBS entfernt. Daraufhin wurden die Schnitte mit einem entsprechenden sekundären Biotin-gekoppelten Antikörper (siehe 2.1.9) für 60 min inkubiert. Auch hier wurden nach der Inkubationszeit die ungebundenen Antikörper durch Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Schnitte für 30 min mit einem Strept.A/B-Komplex/HRP inkubiert, mit PBS gewaschen und mit dem chromogenen Substrat für die Peroxidase (DAB) solange inkubiert bis eine Farbreaktion erkennbar wurde, jedoch höchstens 25 min. Die Reaktion wurde daraufhin mit A. bidest abgestoppt. Zusätzlich wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt. Nach erneutem Waschen mit A. bidest wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit einem Xylen-Substitut behandelt und mit Xylene Substitute Mountant eingedeckt. Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss Axiophot Mikroskop. Als Positivkontrolle diente Deziduagewebe aus reifer humaner Plazenta und als Negativkontrolle Schnitte, die mit PBS/BSA ohne Primärantikörper inkubiert wurden. Die Auswertung der Färbungen erfolgte über semiquantitative Bestimmung des Prozentsatzes angefärbten Gewebes am Gesamtgewebe eines repräsentativen Schnittes, dabei wurde die Intensität der Färbung in neun verschiedene Klassen (0 = keine Färbung bis 8 = sehr starke Färbung) eingeteilt.

Die Immunhistochemie für Prolaktin, aktivierte Caspase 3 als Apoptosemarker und dem Proliferationsmarker Ki-67 wurde im histologischen Labor des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Essen (Leitung: Prof. Dr. Schmid) durchgeführt. Zur Bestimmung der Proliferationsrate der endometrialen Drüsenepithelzellen wurden nach der Ki-67-Färbung von einem repräsentativen Schnitt pro Fragment alle Drüsenepithelzellen ausgezählt und der prozentuale Anteil der Ki-67-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl der Drüsenepithelzellen bestimmt. Zur Ermittlung des prozentualen Anteils Ki-67-positiver Stromazellen wurden bei einer 40fachen Vergrößerung alle gefärbten und ungefärbten Stromazellen eines Gesichtsfeldes (entspricht ca. 30-50% eines Schnittes) ausgezählt.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Expressionsanalysen erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 16.0. Für die Auswertung der RNA- und Proteinexpression wurden jeweils drei unabhängige Messungen mit mindestens drei verschiedenen Fragmenten pro Behandlungsansatz durchgeführt. Bei der histologischen Auswertung der Fragmente wurden von jedem Behandlungsansatz mindestens drei verschiedene Fragmente analysiert. Zur Überprüfung der Signifikanzen wurde ein nicht parametrischer Mann-Whitney-Test für den Vergleich zweier unabhängiger Gruppen eingesetzt. Die Signifikanz wurde anhand des Quantils der zu überprüfenden Unwahrscheinlichkeit festgelegt. Das Quantil, welches mit P angegeben wird, wurde auf einen Wert von $P = 0,05$ festgelegt, wobei dieser Wert eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% angibt. Unterschiede mit $P \leq 0,05$ wurden somit als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung der Oligonukleotid-Primer

Das humane ektope Endometriumgewebe, das in die Peritonealhöhle immundefizienter Mäuse transplantiert wurde, verwächst dort mit murinem Gewebe. Bei der Präparation der humanen ektopen Läsionen nach Versuchsende konnte daher humanes und murines Gewebe nicht vollständig voneinander getrennt werden. Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden daher vorab an humanem Endometrium und murinem Uterusgewebe auf ihre Speziespezifität überprüft um mögliche Kreuzreaktionen mit murinen Sequenzen auszuschließen und somit Veränderungen in der Genexpression spezifisch in den humanen endometrialen Zellen nachweisen zu können.

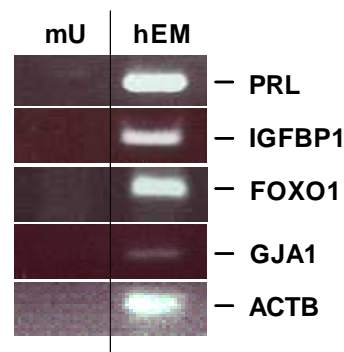


Abb. 1: Nachweis der Speziespezifität der verwendeten Oligonukleotide

Agarosegelelektrophoresen der mit den jeweiligen Oligonukleotiden in einer PCR amplifizierten Produkte. Für die semiquantitativen PCRs wurde cDNA aus humanem Endometrium (hEM) sowie murinem Uterusgewebe (mU) verwendet.

Bei Verwendung der humanspezifischen Oligonukleotide zeigte sich eine Bande für das jeweilige amplifizierte Produkt nur bei humanem endometrialem Gewebe, wodurch Kreuzreaktionen mit murinen Sequenzen ausgeschlossen wurden (Abb. 1).

3.2 Effekt von Progesteron in Kombination mit cAMP-steigernden Substanzen auf die Dezidualisierung

Es ist bekannt, dass die Dezidualisierung von humanem Endometrium durch Progesteron initiiert und aufrechterhalten wird (Ramathal et al., 2010) und dass humane Endometriumzellen *in vitro* bei Zugabe von Progesteron dezidualisieren (Gellersen und

Brosens, 2003). Es konnte zudem gezeigt werden, dass der Ausmaß der Dezidualisierung humaner Endometriumzellen durch eine kombinierte Behandlung mit Gestagen und cAMP signifikant verstärkt wird (Gellersen und Brosens, 2003). Um zu überprüfen, ob die Dezidualisierung von ektopem Endometriumgewebe *in vivo* durch Progesteron alleine oder in Kombination mit Substanzen, die den cAMP-Signalweg aktivieren, induziert werden kann, wurde nach Transplantation endometrialer Fragmente in NOD-SCID-Mäuse eine Behandlung dieser Mäuse mit Progesteron alleine oder in Kombination mit Forskolin, einem Adenylatzyklaseaktivator oder mit hCG, welches hauptsächlich über den cAMP-Signalweg wirkt, durchgeführt. Für jeden Versuchsansatz wurde das Gewebe derselben Patientin parallel in 4 NOD-SCID-Mäuse transplantiert. Die Mäuse erhielten folgende Behandlungen: 1. Progesteron (50 µg/d, s.c.), 2. Progesteron (50 µg/d, s.c.) + Forskolin (100 µg/d, i.p.), 3. Progesteron (50 µg/d, s.c.) + hCG (7,5 IU/d, i.p.), 4. Vehikelkontrolle. Die Substanzapplikation erfolgte täglich über einen Zeitraum von 7 Tagen. 24 Stunden nach der letzten Applikation wurden die endometrialen Gewebefragmente entnommen, wie unter 2.2.2.4 beschrieben aufgearbeitet und im Hinblick auf Größe, Gewicht, Morphologie, Proliferationsrate und Expression verschiedener Dezidualisierungsmarker analysiert.

3.2.1 Effekt auf das Uterusgewicht der Maus

Um eine mögliche Wirkung der verwendeten Substanzen auf das Endometrium der Mäuse zu untersuchen, wurde der Uterus jeder Maus am Ende der Versuchsreihe entnommen und das Naßgewicht bestimmt. Das Gewicht wurde auf das Körpergewicht der Maus bezogen und prozentual dargestellt. Die Uterusgewichte waren in den behandelten Mäusen tendenziell reduziert, zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen (Abb. 2).

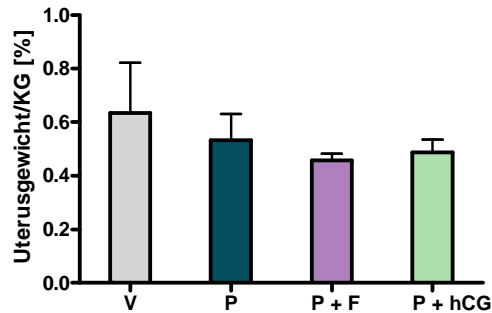


Abb. 2: Uterusgewichte der NOD-SCID Mäuse nach 7tägiger Behandlung

Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler der Uterusgewichte als prozentualer Anteil am Körpergewicht (KG). V = Vehikel; P = Progesteron; F = Forskolin; hCG = humanes Choriongonadotropin.

3.2.2 Effekt auf die humanen ektopen endometrialen Läsionen

3.2.2.1 Größe und Gewicht der ektopen humanen endometrialen Läsionen

Nach 7tägiger Kultur in NOD-SCID-Mäusen wurde die Größe der ektopen endometrialen Fragmente *in situ* gemessen. Anschließend wurden die endometrialen Gewebefragmente entnommen und deren Gewicht bestimmt.

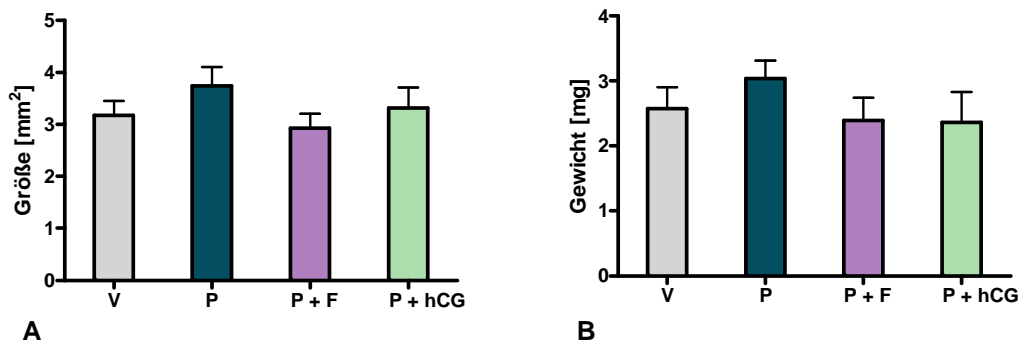


Abb. 3: Wachstumsverhalten der ektopen Läsionen

Größe (A) und Gewicht (B) der humanen endometrialen Fragmente nach 7tägiger Kultur und Behandlung in der NOD-SCID Maus. Pro Behandlungsgruppe wurden 16 Fragmente analysiert. Gewicht und Größe sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. V = Vehikel; P = Progesteron; F = Forskolin; hCG = humanes Choriongonadotropin.

Es zeigte sich eine Korrelation der Größe und des Gewichtes der ektopen Fragmente. Sowohl die Fragmentgröße als auch das -gewicht waren nach Behandlung mit Progesteron alleine tendenziell erhöht (Abb. 3). Die kombinierte Behandlung von Progesteron mit Forskolin bzw. hCG führte zu einer leichten Gewichtsabnahme der Fragmente im

Vergleich zur Vehikelkontrolle (Abb. 3B). Bei keiner Behandlung wurde jedoch ein signifikanter Unterschied in Größe oder Gewicht der ektopen endometrialen Läsionen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt.

3.2.2.2 Morphologie der ektopen humanen endometrialen Läsionen

Die Auswertung der Paraffin-Serienschnitte zeigte eine gut erhaltene Morphologie der humanen endometrialen Fragmente nach 7tägiger Kultivierungsdauer in den NOD-SCID Mäusen. Es ließen sich charakteristische endometriale Histomorphologien mit Drüsen und umgebendem Stroma erkennen (Abb. 4A-D). Dezidualisierte Zellen sind leicht anhand ihres epitheloiden Erscheinungsbildes zu definieren. Mit steigender Dezidualisierung sind die Zellgrenzen weniger deutlich zu erkennen, wahrscheinlich aufgrund der verstärkten Bildung extrazellulärer Matrix (Frank et al., 1994). Areale mit dezidualisierten Zellen wurden in allen Läsionen gefunden. In Kontrollfragmenten (Abb. 4A) und nach Behandlung mit Progesteron alleine (Abb. 4B) waren jedoch nur wenige kleine Areale dezidualisierter Zellen zu erkennen. Nach Behandlung mit Forskolin in Kombination mit Progesteron (Abb. 4C) fand eine Zunahme dezidualisierter stromaler Zellen statt. Nach kombinierter Behandlung von Progesteron und hCG waren große dezidualisierte Areale zu beobachten (Abb. 4D). Die dezidualisierten Areale wurden morphometrisch quantifiziert (Abb. 4E). In ektopem humanem endometrialem Gewebe, welches mit einer Kombination von Progesteron und Forskolin behandelt wurde, war die Gesamtfläche dezidualisierten Stromas im Vergleich zur Kontrolle und zu den Läsionen, die mit Progesteron alleine behandelt wurden, erhöht. Nach 7tägiger kombinierter Behandlung von Progesteron und hCG wurde die stärkste Zunahme dezidualisierter Areale festgestellt.

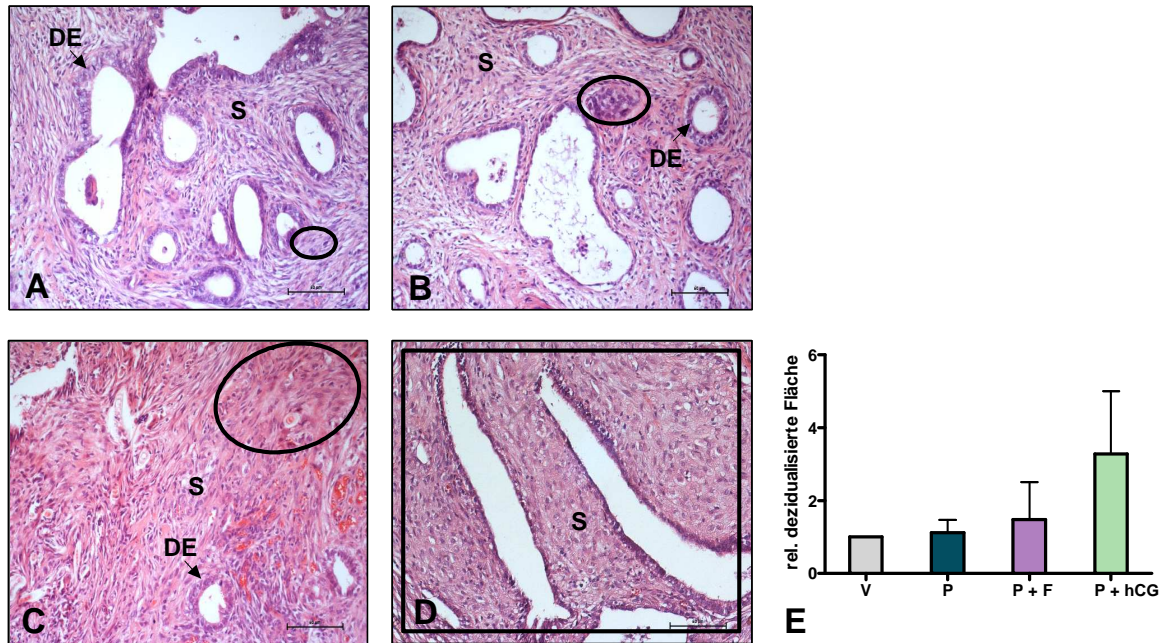


Abb. 4: Histomorphologische Analyse der ectopen Läsionen

Histomorphologie humaner endometrialer Fragmente nach 7tägiger Kultur in unbehandelten (A) sowie behandelten (B-D) NOD-SCID Mäusen. (B) Progesteron; (C) Progesteron kombiniert mit Forskolin; (D) Progesteron kombiniert mit hCG. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und zeigen charakteristische Strukturen endometrialen Gewebes. Bereiche mit dezidualisierten stromalen Zellen sind umrandet. DE = Drüsenepithel; S = Stroma. Balken = 50 μ m. (E) Morphometrische Quantifizierung dezidualisierter Areale. Pro Behandlungsgruppe wurden vier Fragmente analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. Der prozentuale Anteil der dezidualisierten Fläche an der Gesamtfläche des Vehikelfragmentes wurde gleich 1 gesetzt und die x-fache Fläche im Substanz behandelten Tier entsprechend bestimmt. V = Vehikel; P = Progesteron; F = Forskolin; hCG = humanes Choriongonadotropin.

3.2.2.3 Expression von Dezidualisierungsmarkern in den ectopen humanen endometrialen Läsionen

Der Grad der Dezidualisierung wurde in ectopen endometrialen Fragmenten nach Kultur in unterschiedlich behandelten NOD-SCID Mäusen mit Hilfe verschiedener Dezidualisierungsmarker analysiert.

Deziduales PRL und IGFBP-1

Die Quantifizierung der klassischen Dezidualisierungsmarker dPRL und IGFBP-1 in den ectopen endometrialen Läsionen erfolgte auf Transkriptionsebene durch eine quantitative PCR (Abb. 5AB). Während eine alleinige Substitution mit Progesteron keinen Effekt zeigte, war eine leichte Erhöhung der Transkription der Dezidualisierungsmarker *dPRL* und *IGFBP-1* nach Behandlung mit Progesteron und Forskolin und ein signifikanter

Anstieg der *dPRL*- und *IGFBP1*-Expression in den ektopen endometrialen Fragmenten nach 7tägiger Kultur in NOD-SCID-Mäusen, die mit einer Kombination von Progesteron und hCG behandelt wurden, im Vergleich zum Vehikel und den anderen Behandlungen zu verzeichnen. Die Expression von *dPRL* und *IGFBP1* in den ektopen endometrialen Fragmenten konnte somit durch cAMP-steigernde Substanzen erhöht werden, wobei die Applikation von hCG zu einer signifikant höheren Steigung von *IGFBP1* führte als Forskolin.

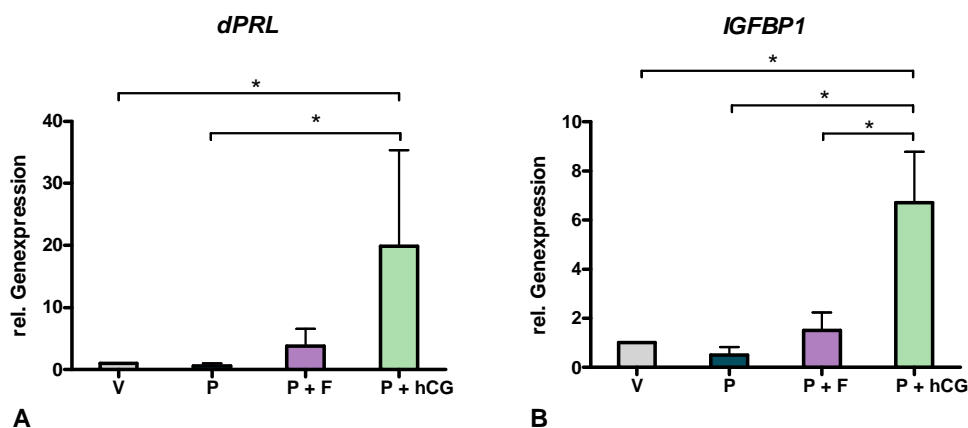


Abb. 5: Expression von *dPRL* und *IGFBP1*

Relative Genexpression von *dPRL* (A) und *IGFBP1* (B) in ektopen humanen endometrialen Fragmenten nach 7tägiger Kultur in NOD-SCID Mäusen. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert \pm Standardfehler der Expression dreier Patientinnen. Es wurde gegen das entsprechende *ACTB*-Signal abgeglichen. Die relative Expression des Vehikelfragmentes wurde gleich 1 gesetzt und die x-fache Expression im Substanz behandelten Tier entsprechend bestimmt. Die *dPRL*- und *IGFBP1*-Expression ist nach kombinierter Behandlung von Progesteron und hCG signifikant hochreguliert (* $p \leq 0,05$). V = Vehikel; P = Progesteron; F = Forskolin; hCG = humanes Choriongonadotropin.

Da *dPRL*- und *IGFBP1*-Proteine sezerniert werden, kommen sie nur in geringen Mengen in den sezernierenden Zellen vor. Aus diesem Grund war es nicht möglich, Prolaktin und *IGFBP1* in Western Blots mit Proteinproben aus den isolierten ektopen Läsionen zu detektieren. Diese Beobachtung stimmt mit denen anderer Gruppen überein (Birgit Gellersen, persönliche Mitteilung). Um die dezidualisierten Areale näher zu analysieren, wurde daher in den in unbehandelten und behandelten Mäusen kultivierten ektopen endometrialen Läsionen das Hormon *dPRL* immunhistochemisch untersucht. Als Positivkontrolle wurde dezidualisiertes Gewebe einer reifen Plazenta verwendet. Wie in Abb. 6A zu erkennen ist, wurden auch im Kontrollgewebe nicht alle dezidualisierten Zellen angefärbt, da das deziduale Prolaktin sezerniert wird und daher nicht zu jedem Zeitpunkt in ausreichender Menge in allen Zellen vorhanden ist um detektiert werden zu

können. Eine ähnliche Färbung wurde in dezidualisierten Arealen humaner ektooper endometrialer Fragmente nach Behandlung mit Progesteron und hCG beobachtet (Abb. 6B). Nur die kombinierte Behandlung mit Progesteron und hCG induzierte eine ausreichende Menge an Prolaktinprotein, so dass dieses immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte, während in allen anderen Versuchsgruppen keine immunhistochemische Färbung beobachtet werden konnte (Abb. 6C-E). Somit korrelierte die in der quantitativen PCR beobachtete Expressionssteigerung mit einem Anstieg der Proteinexpression in mit Progesteron und hCG behandeltem ektooper endometrialen Gewebe.

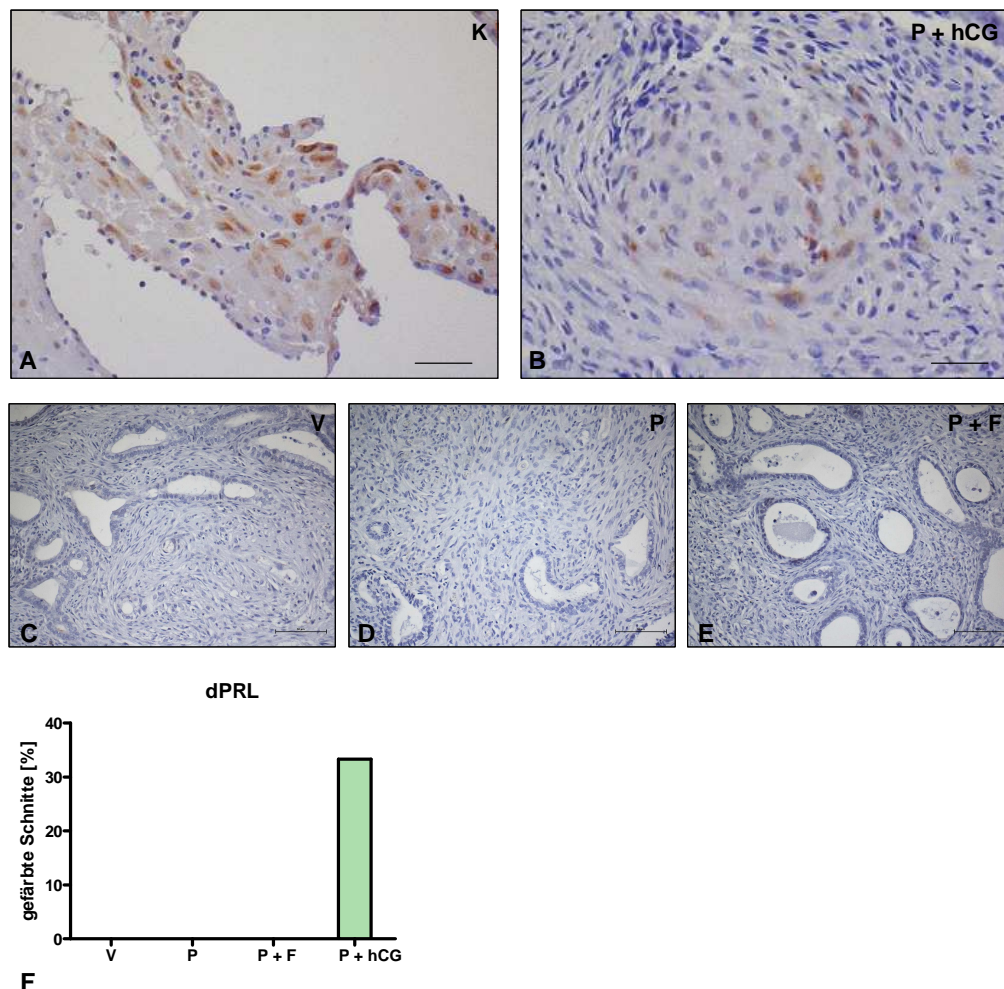


Abb. 6: Immunhistochemischer Nachweis der dPRL-Expression

(A-F) Immunhistochemischer Nachweis von dPRL. (A) Färbung humaner Dezidua für dPRL (braun). (B) Ektopes endometriales Fragment nach 7tägiger kombinierter Behandlung von Progesteron und hCG. Es ist eine deutliche stromale Färbung zu erkennen. (C) unbehandelte Kontrolle; (D) Progesteron; (E) Progesteron kombiniert mit Forskolin. Balken A, B = 30 μ m, Balken C-E = 50 μ m. (F) Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung für dPRL. K = Positivkontrolle; V = Vehikel; P = Progesteron; F = Forskolin; hCG = humanes Choriongonadotropin.

FOXO1 und GJA1

Die Expression der Dezidualisierungsmarker *FOXO1* (Abb. 7A) und *GJA1* (Abb. 7B) wurde sowohl durch die Behandlung mit Progesteron und Forskolin als auch durch Progesteron und hCG signifikant in den ektopen endometrialen Fragmenten hochreguliert.

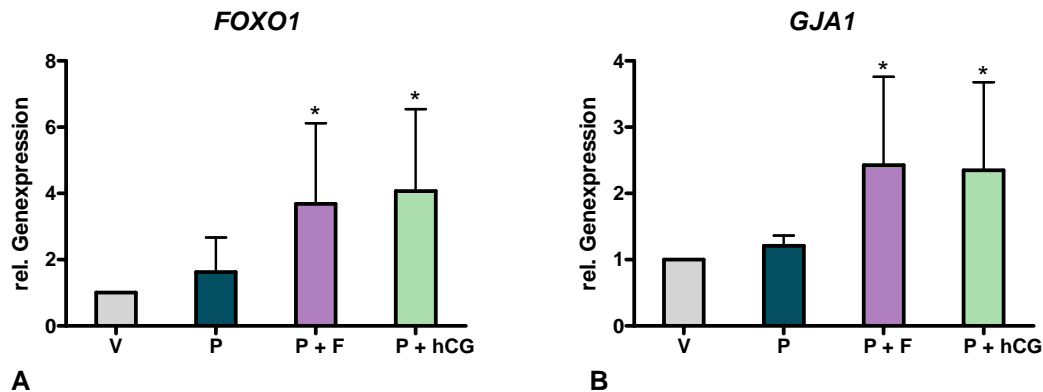


Abb. 7: Expression von *FOXO1* und *GJA1*

Relative Genexpression von *FOXO1* (A) und *GJA1* (B) in ektopen humanen endometrialen Fragmenten nach 7tägiger Kultur in NOD-SCID-Mäusen. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert \pm Standardfehler dreier Patientinnen. Es wurde gegen das entsprechende *ACTB*-Signal abgeglichen. Die relative Expression des Vehikelfragmentes wurde gleich 1 gesetzt und die x-fache Expression im Substanz behandelten Tier entsprechend bestimmt. * $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Vehikelkontrolle. V = Vehikel; P = Progesteron; F = Forskolin; hCG = humanes Choriongonadotropin.

Es stellte sich heraus, dass selbst von dezidualisiertem Gewebe einer reifen Plazenta 100 μ g Gesamtprotein benötigt wurden, um die FOXO1-Expression mittels Western Blot detektieren zu können. Diese Menge an Gesamtprotein konnte aus den kleinen endometrialen Fragmenten nicht in ausreichendem Maße isoliert werden. Daher wurde die FOXO1-Expression auf Proteinebene immunhistochemisch analysiert und quantifiziert. Die immunhistochemischen Färbungen zeigten nur nach kombinierter Behandlung mit Progesteron und hCG eine großflächige Expression von FOXO1 in den endometrialen Stromazellen (Abb. 8D). Im Vehikelfragment und nach Behandlung mit Progesteron alleine oder in Kombination mit Forskolin waren - wenn überhaupt - nur kleine Areale angefärbter Zellen zu beobachten (Abb. 8A-C). Die semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen zeigte 7 Tage nach der Transplantation nur in den ektopen Fragmenten, die in mit Progesteron und hCG behandelten Mäusen kultiviert wurden, eine signifikante Erhöhung der FOXO1-Expression im Vergleich zur Kontrolle.

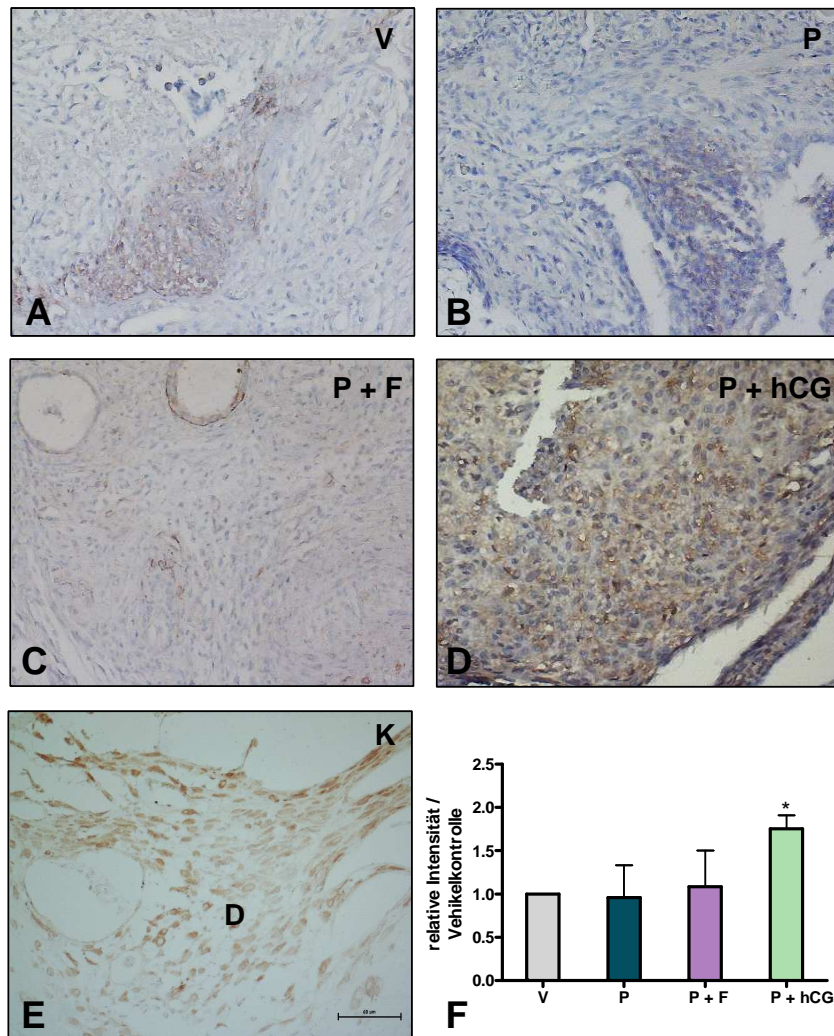


Abb. 8: Immunhistochemischer Nachweis der FOXO1-Expression

FOXO1-Expression nach Kultivierung in unbehandelten (A), mit Progesteron (B), Progesteron und Forskolin (C), Progesteron und hCG (D) behandelten NOD-SCID-Mäusen nach 7 Tagen Kultur. (E) Färbung humaner Dezidua für FOXO1 als Positivkontrolle. Balken = 50 μm . (F) Semiquantitative Auswertung der FOXO1-Färbung. Pro Behandlungsgruppe wurden vier Fragmente analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. Die relative Intensität des Vehikelfragmentes wurde gleich 1 gesetzt. * $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Vehikelkontrolle. K = Positivkontrolle; V = Vehikel; P = Progesteron; F = Forskolin; hCG = humanes Choriongonadotropin.

Zur Lokalisation der GJA1-Expression wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde dezidualisiertes Gewebe einer reifen Plazenta verwendet (Abb. 9E). Es war eine starke Färbung der Membran dezidualisierter Zellen zu erkennen. In den Kontrollfragmenten (Abb. 9A) und den mit Progesteron und Forskolin (Abb. 9C) behandelten Fragmenten waren vereinzelt Zellen zu sehen, die eine Expression von GJA1 zeigten. Nach Behandlung mit Progesteron alleine (Abb. 9B) und nach kombinierter Behandlung von Progesteron und hCG (Abb. 9D) war jedoch der

überwiegende Teil der Stromazellen der jeweiligen Fragmente angefärbt. Endometriale Drüsenepithelzellen zeigten keine Expression von GJA1.

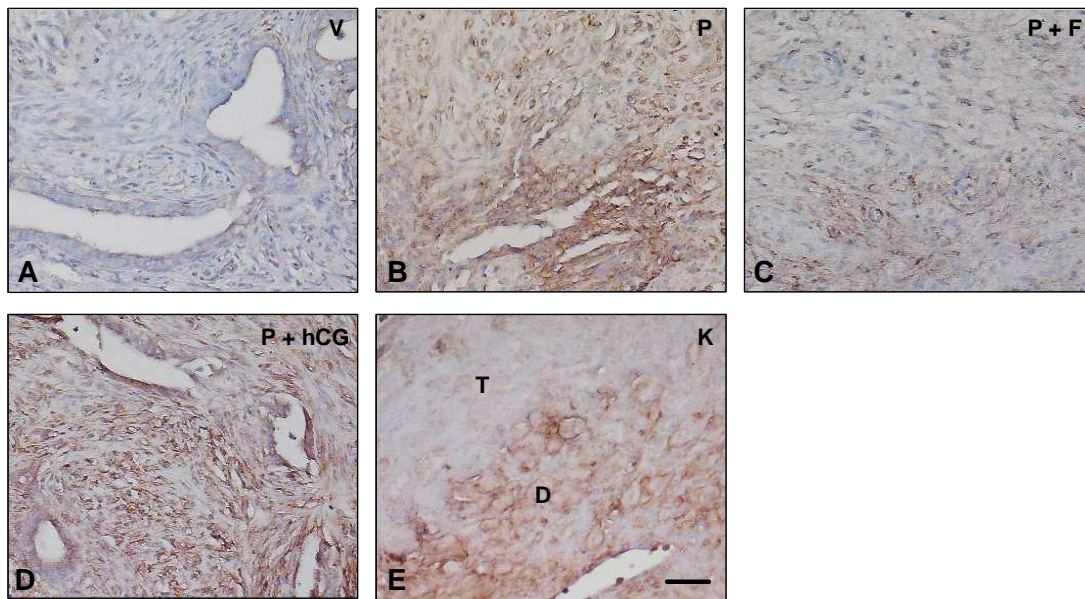


Abb. 9: Immunhistochemischer Nachweis der GJA1-Expression

GJA1-Expression nach Kultivierung in unbehandelten (A), mit Progesteron (B), Progesteron und Forskolin (C) und Progesteron und hCG (D) behandelten NOD-SCID-Mäusen nach 7 Tagen Kultur. (E) Dezidualisiertes Gewebe einer reifen Plazenta als Positivkontrolle. K = Positivkontrolle; V = Vehikel; P = Progesteron; F = Forskolin; hCG = humanes Choriongonadotropin; T = Tropoblast; D = Dezidua. Balken = 40 µm.

Das Gap Junction-Protein GJA1 ist ein membranständiges Protein und konnte im Gegensatz zu den sezernierten Proteinen Prolaktin und IGFBP1 gut im Western Blot nachgewiesen werden. Das GJA1-Protein liegt in der Zelle unterschiedlich stark phosphoryliert vor. Diese Phosphorylierungsstadien sind im Western Blot anhand drei unterschiedlicher Banden zu erkennen (Abb. 10B). Densitometrisch ausgewertet wurde GJA1-Gesamtprotein unabhängig vom Phosphorylierungsstatus (Abb. 10A). Korrespondierend zu der quantitativen PCR stieg die GJA1-Proteinexpression nach kombinierter Behandlung mit Progesteron und hCG im Vergleich zum Vehikel und den anderen Behandlungen am stärksten an, jedoch war dieser Anstieg nicht signifikant. Das Ergebnis der Western Blot-Analyse korrelierte somit zu der immunhistochemischen Ausprägung der GJA1-Expression.

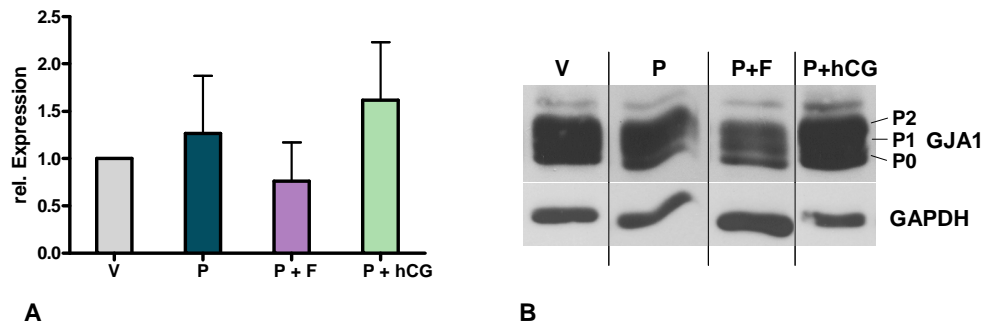


Abb. 10: Expressionsanalyse von GJA1

(A) Densitometrische Auswertung der Western Blots für GJA1 ($n = 3$). Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardfehler, die gegen das entsprechende GAPDH-Signal abgeglichen wurden. (B) Repräsentativer Western Blot. Bei P0-P2 handelt es sich um unterschiedliche Phosphorylierungsstadien von GJA1 (P0 = 41 kDa, P1 = 44 kDa, P2 = 46 kDa). V = Vehikel; P = Progesteron; F = Forskolin; hCG = humanes Choriongonadotropin.

CD82

Das CD82 (*cluster of differentiation 82*)-Protein, ein Zelloberflächenprotein der Tetraspaninfamilie, ist in den Prozess der dezidualen Umbildung endometrialer Stromazellen involviert und wird während der Dezidualisierung heraufreguliert (Gellersen et al., 2007). Da das Expressionslevel des Dezidualisierungsmarkers CD82 bekanntermaßen posttranskriptionell reguliert wird (Gellersen et al., 2007), wurde das CD82-Expressionslevel nur auf Proteinebene untersucht. Im Western Blot zeigte sich, dass die CD82-Expression nach kombinierter Behandlung mit Progesteron und Forskolin leicht anstieg. Diese Tendenz war nach kombinierter Behandlung mit Progesteron und hCG noch etwas stärker (Abb. 11). Der beobachtete Anstieg nach Behandlung mit Forskolin oder hCG war jedoch nicht signifikant.

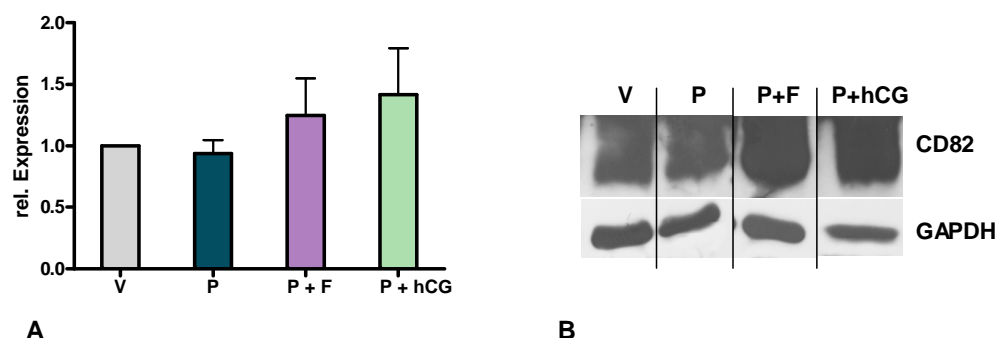


Abb. 11: Expressionsanalyse von CD82

(A) Densitometrische Auswertung der Western Blots für CD82. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der verschiedenen Messungen ($n = 3$), die gegen das entsprechende GAPDH-Signal abgeglichen wurden. (B) Repräsentativer Western Blot. V = Vehikel; P = Progesteron; F = Forskolin; hCG = humanes Choriongonadotropin.

Auch für den immunhistochemischen Nachweis von CD82 wurde als Positivkontrolle dezidualisiertes Gewebe einer reifen Plazenta verwendet. In Abb. 12E ist eine spezifische Färbung des membrandurchspannenden Glykoproteins in der Membran dezidualisierter Zellen zu erkennen. Die ektopen endometrialen Gewebefragmente aus den Kontrolltieren (Abb. 12A) sowie aus den nur mit Progesteron behandelten Tieren (Abb. 12B) zeigten keine Färbung für CD82. Nach Behandlung mit Progesteron und Forskolin waren größere Zellareale zu beobachten, in denen die Zellmembranen angefärbt waren (Abb. 12C). Nach kombinierter Behandlung von Progesteron und hCG war fast das ganze Fragment spezifisch gefärbt (Abb. 12D). Die immunhistochemische Färbung spiegelte somit das Ergebnis der Western Blot-Analyse zur CD82-Expression wider.

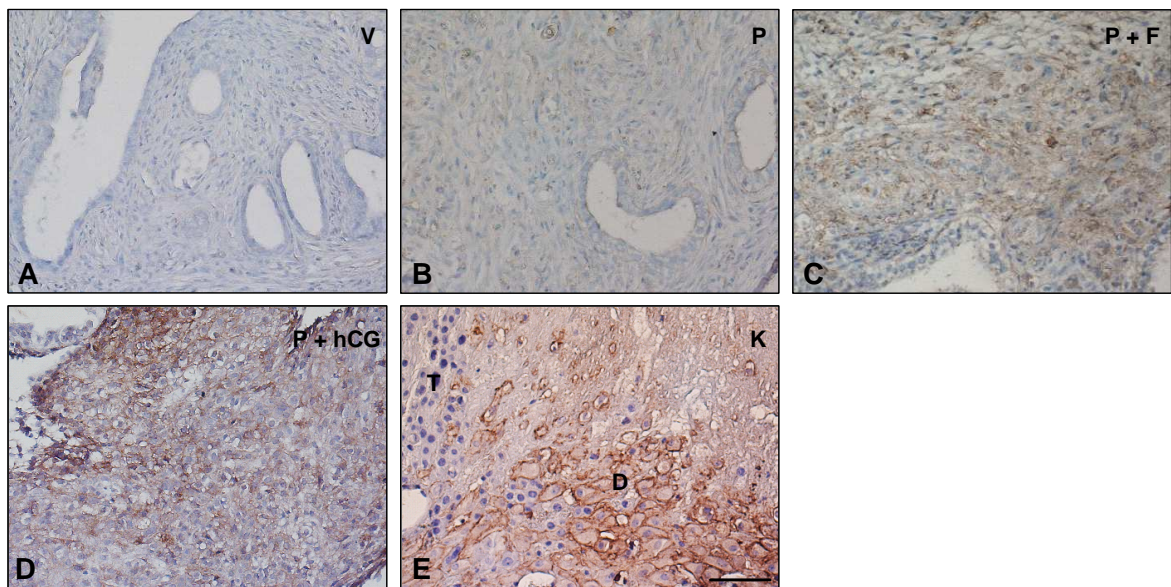


Abb. 12: Immunhistochemischer Nachweis der CD82-Expression

CD82-Expression nach Kultivierung in unbehandelten (A), mit Progesteron (B), Progesteron und Forskolin (C) und Progesteron und hCG (D) behandelten NOD-SCID-Mäusen nach 7 Tagen Kultur. (E) Dezidualisiertes Gewebe einer reifen Plazenta als Positivkontrolle. K = Positivkontrolle; V = Vehikel; P = Progesteron; F = Forskolin; hCG = humanes Choriongonadotropin; T = Tropoblast; D = Dezidua. Balken A-E = 50 µm.

3.2.2.4 Proliferation der ektopen humanen endometrialen Läsionen

Es konnte in den vorhergehenden Kapiteln gezeigt werden, dass humanes ektopes endometriales Gewebe *in vivo* durch eine Kombination von Progesteron und einer cAMP-steigernden Substanz dezidualisiert werden kann. Daher wurde als nächstes untersucht, ob

mit dieser kombinierten Behandlung auch ein Proliferationsstopp in den ektopen endometrialen Läsionen hervorgerufen wird. Der Proliferationsmarker Ki-67 wurde dazu immunhistochemisch analysiert, um einen Effekt der unterschiedlichen Behandlungen auf die Proliferation der in NOD-SCID-Mäusen kultivierten endometrialen Fragmente zu untersuchen. Die mit Ki-67 gefärbten Zellkerne im Drüsenepithel sowie im Stroma wurden im Verhältnis zur Gesamtzahl der Epithel- bzw. Stromazellen ausgezählt und als prozentuale Proliferationsrate angegeben.

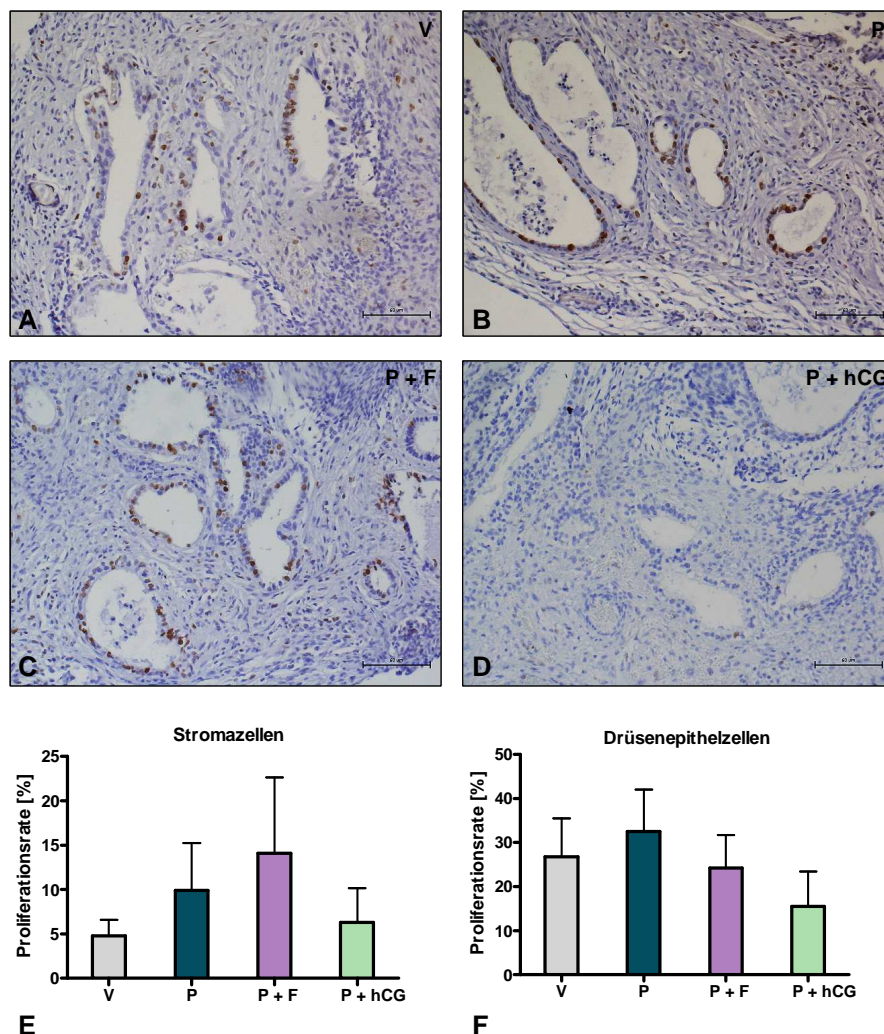


Abb. 13: Proliferation der ektopen Läsionen

Nachweis der Proliferation in humanen endometrialen Fragmenten nach Kultivierung in der NOD-SCID Maus über 7 Tage unter Behandlung verschiedener Substanzen. (A-D) Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki-67. Die Zellkerne proliferierender Zellen sind braun gefärbt. Es wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt. (A) Vehikel; (B) Progesteron; (C) Progesteron + Forskolin; (D) Progesteron + hCG. Balken: = 50 µm. (E,F) Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung der Stromazellen (E) sowie Drüsenepithelzellen (F). Pro Behandlungsgruppe wurden vier Fragmente analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. V = Vehikel; P = Progesteron; F = Forskolin; hCG = humanes Choriongonadotropin.

Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen ergab für das Stroma sowie das Drüsenepithel der mit Progesteron alleine und für das Stroma der mit Progesteron und Forskolin behandelten endometrialen Fragmente eine tendenziell erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zur Vehikelkontrolle (Abb. 13EF), während die Proliferationsrate im Drüsenepithel nach 7tägiger kombinierter Behandlung mit Progesteron und hCG reduziert war (Abb. 13F). Im Stroma der ektopen endometrialen Fragmente war die Proliferationsrate nach kombinierter Behandlung mit Progesteron und hCG niedriger im Vergleich zur Behandlung mit Progesteron alleine oder in Kombination mit Forskolin, es war jedoch kein Unterschied im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten (Abb. 13E).

3.3 Vergleich des Effektes der Kombination von hCG mit Progesteron bzw. Medroxyprogesteronacetat (MPA) auf die Dezidualisierung

Medroxyprogesteronacetat (MPA) ist ein synthetisches Gestagen, welches zusätzlich zu den Progesteronrezeptoren auch an die Glucocorticoidrezeptoren bindet und diese aktiviert (Moghissi und Boyce, 1976; Bruner-Tran et al., 2006). *In vitro* erzielt die kombinierte Gabe von MPA und cAMP einen stärkeren Effekt auf die Dezidualisierung humaner endometrialer Stromazellen als die Gabe von Progesteron und cAMP, während MPA alleine nur einen schwachen Effekt auf die Dezidualisierung auslöst (Gellersen und Brosens, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob MPA in Kombination mit hCG auch auf die Dezidualisierung von ektopem humanem Endometriumgewebe *in vivo* besser wirkt als Progesteron und hCG. Hierzu wurde pro Versuchsansatz Gewebe einer Patientin parallel in drei NOD-SCID-Mäuse transplantiert. Die Mäuse erhielten folgende Behandlungen: 1. Progesteron (50 µg/d) + hCG (7,5 IU/d), 2. MPA (50 µg/d) + hCG (7,5 IU/d), 3. Vehikelkontrolle. Zudem wurde die Dauer der Behandlung von 7 auf 10 Tage erhöht um zu untersuchen, ob der Effekt auf die Dezidualisierung durch eine längere Behandlung gesteigert werden kann. 24 Stunden nach der letzten Applikation wurden die endometrialen Gewebefragmente entnommen und aufgearbeitet.

3.3.1 Effekt auf das Uterusgewicht der Maus

Nach Beendigung des Versuches wurde den NOD-SCID-Mäusen der Uterus entnommen und das Naßgewicht bestimmt. Das Organgewicht wurde auf das Körpergewicht der Maus bezogen und prozentual dargestellt. Die Uterusgewichte zeigten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen (Abb. 14).

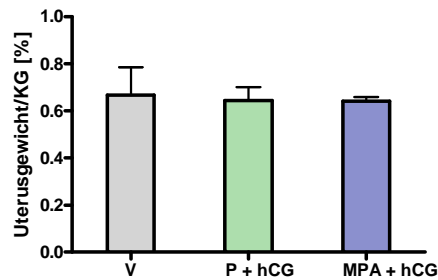


Abb. 14: Uterusgewichte der NOD-SCID Mäuse nach 10tägiger Behandlung

Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler der Uterusgewichte als prozentualer Anteil am Körpergewicht (KG) nach 10tägiger Behandlung der NOD-SCID Mäuse. Es zeigt sich kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ($n = 5$). V = Vehikel; P = Progesteron; MPA = Medroxyprogesteronacetat; hCG = humanes Choriongonadotropin.

3.3.2 Effekt auf die humanen ektopen endometrialen Läsionen

3.3.2.1 Größe und Gewicht der ektopen humanen endometrialen Läsionen

Nach 10 Tagen Kultur wurden den unterschiedlich behandelten NOD-SCID-Mäusen die endometrialen Gewebefragmente entnommen und deren Größe und Gewicht bestimmt. Die kombinierte Behandlung mit MPA und hCG hatte ebenso wie die Behandlung mit Progesteron und hCG keinen Einfluss auf die Größe der endometrialen Gewebefragmente (Abb. 15A). Tendenziell zeigte sich eine Zunahme des Gewichtes der endometrialen Läsionen nach Behandlung mit Progesteron bzw. MPA und hCG im Vergleich zur Kontrolle, jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 15B).

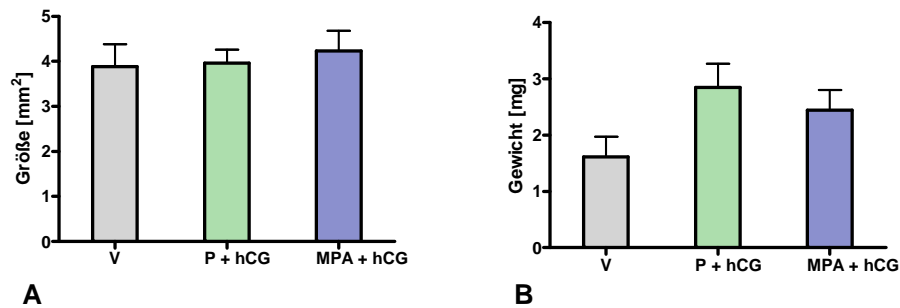


Abb. 15: Wachstumsverhalten der ektopen Läsionen

Größe (A) und Gewicht (B) der humanen endometrialen Fragmente nach 10tägiger Kultur in NOD-SCID Mäusen. Pro Behandlungsgruppe wurden 20 Fragmente analysiert. Gewicht und Größe sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. V = Vehikel; P = Progesteron; MPA = Medroxyprogesteronacetat; hCG = humanes Choriongonadotropin.

3.3.2.2 Morphologie der ektopen humanen endometrialen Läsionen

Nach 10tägiger Kultur und Behandlung in der NOD-SCID-Maus wurde die Morphologie der ektopen humanen endometrialen Läsionen untersucht. In den Kontrollfragmenten (Abb. 16A) waren - wie zuvor nach 7tägiger Behandlung (vgl. Abb. 4A) - nur kleine Areale dezidualisierter Zellen zu erkennen. Nach Behandlung mit hCG in Kombination mit Progesteron (Abb. 16B) bzw. mit MPA (Abb. 16C) waren große dezidualisierte Areale zu beobachten. Die morphometrische Quantifizierung ergab eine signifikante Zunahme dezidualisierter Areale nach 10tägiger kombinierter Behandlung mit hCG und Progesteron bzw. MPA (Abb. 16D), jedoch waren die interindividuellen Schwankungen nach Behandlung mit MPA und hCG sehr hoch. Schon bei der morphologischen Betrachtung der ektopen Läsionen fiel auf, dass das Gewebe mancher Patientinnen nur schwach auf MPA ansprach, wohingegen in dem Gewebe anderer Patientinnen eine extrem starke Dezidualisierungsreaktion ausgelöst wurde. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen mit den beiden verschiedenen Gestagenen.

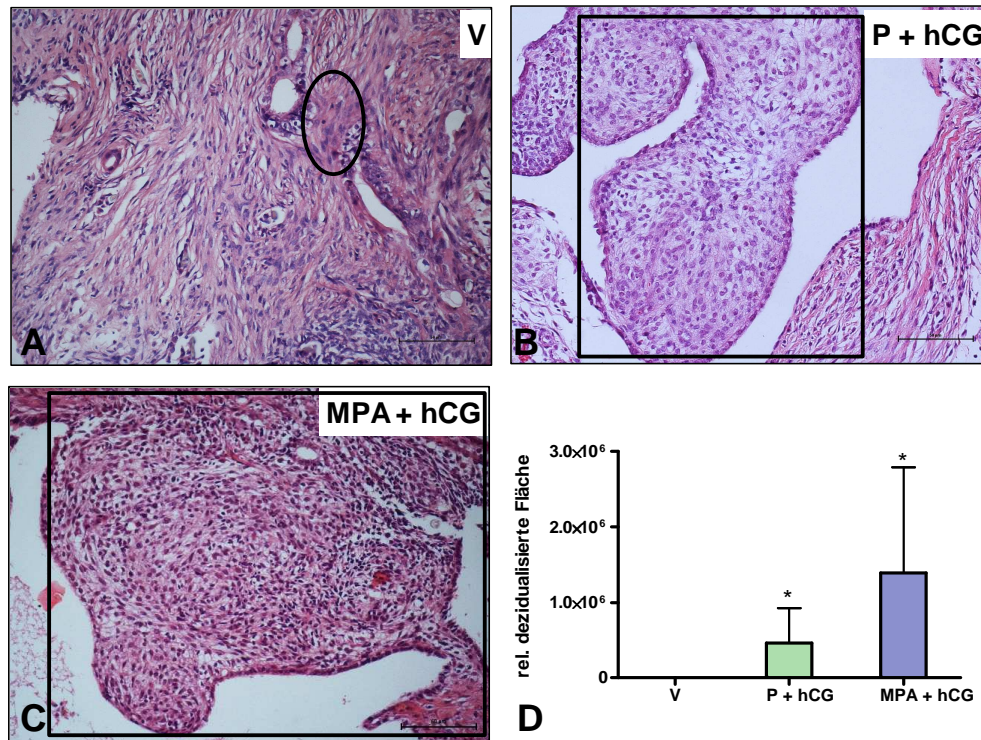


Abb. 16: Histomorphologische Analyse der ektopen Läsionen

Histomorphologie humaner endometrialer Fragmente nach 10tägiger Kultur in unbehandelten (A) sowie mit Progesteron und hCG (B) und MPA und hCG (C) behandelten NOD-SCID Mäusen. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und zeigen charakteristische Strukturen endometrialen Gewebes. Bereiche mit dehydualisierten stromalen Zellen sind umrandet. Balken = 50 μ m. (D) Morphometrische Quantifizierung dehydualisierter Areale. Pro Behandlungsgruppe wurden fünf Fragmente analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. Der prozentuale Anteil der dehydualisierten Fläche an der Gesamtfläche des Vehikelfragmentes wurde gleich 1 gesetzt und die x-fache Fläche im Substanz behandelten Tier entsprechend bestimmt. * $p \leq 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. V = Vehikel; P = Progesteron; MPA = Medroxyprogesteronacetat; hCG = humanes Choriongonadotropin.

3.3.2.3 Expression von Dehydualisierungsmarkern in den ektopen humanen endometrialen Läsionen

Der Grad der Dehydualisierung in den ektopen endometrialen Fragmenten wurde nach 10tägiger Behandlung und Kultur in NOD-SCID-Mäusen mit Hilfe verschiedener Dehydualisierungsmarker analysiert. Im Folgenden wurde nur noch dehydualisiertes PRL als einer der beiden Hauptsekretionsprodukte dehydualisierter Zellen als spezifischer Marker untersucht.

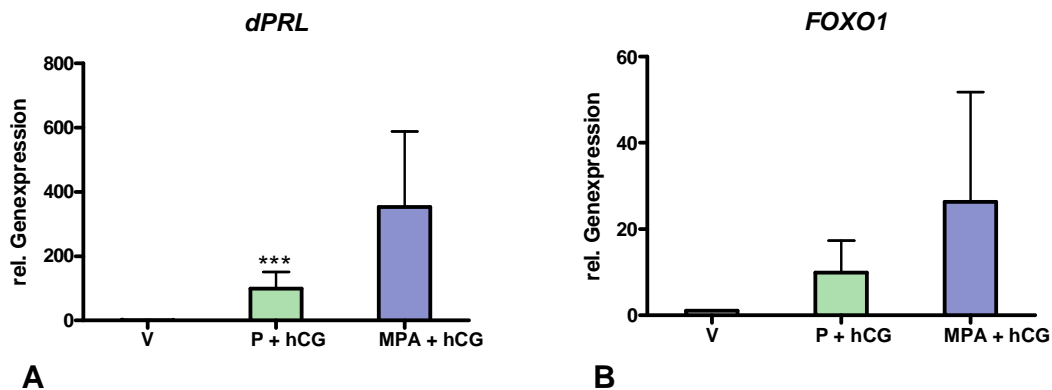


Abb. 17: Expression verschiedener Dezidualisierungsmarker auf Transkriptionsebene

Relative Genexpression von *dPRL* (A) und *FOXO1* (B) in ektopen humanen endometrialen Fragmenten nach 10tägiger Kultur in NOD-SCID Mäusen. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert \pm Standardfehler ektoper Fragmente fünf verschiedener Patientinnen. Es wurde gegen das entsprechende *ACTB*-Signal abgeglichen. Die relative Expression des Vehikelfragmentes wurde gleich 1 gesetzt und die x-fache Expression im Substanz behandelten Tier entsprechend bestimmt. Die *dPRL*-Expression ist nach kombinierter Behandlung von Progesteron und hCG im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant hochreguliert ($*** \leq 0,005$). V = Vehikel; P = Progesteron; MPA = Medroxyprogesteronacetat; hCG = humanes Choriongonadotropin.

In Abb. 17A sind die Ergebnisse der quantitativen PCR für die *dPRL*-Expression in den ektopen humanen endometrialen Fragmente dargestellt. Hierbei zeigte sich nach kombinierter Behandlung mit Progesteron und hCG eine stark signifikante Erhöhung der *dPRL*-Expression ($p = 0,005$) im Vergleich zur Vehikelkontrolle. Somit ruft eine 10tägige Behandlung offensichtlich einen deutlicheren Effekt hervor als eine 7tägige Behandlung (vgl. Abb. 5). Die kombinierte Behandlung von MPA und hCG führte zwar ebenfalls zu einer erhöhten *dPRL*-Expression, diese war jedoch nicht signifikant, obwohl der Mittelwert einer 350fachen Expressionserhöhung im Vergleich zum Vehikel entsprach, da das Endometriumgewebe mancher Patientinnen auf diese Behandlung kaum mit einem Anstieg der *dPRL*-Expression reagierte.

Im Hinblick auf die Transkription von *FOXO1* zeigte sich nach täglicher Applikation von hCG in Kombination mit Progesteron bzw. MPA über einen Zeitraum von 10 Tagen ein tendenzieller Anstieg der *FOXO1*-Expression in den ektopen endometrialen Fragmenten im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 17B). Auch bei dieser Expressionsanalyse bestätigte sich, dass nach einer kombinierten Behandlung von MPA und hCG die interindividuellen Schwankungen deutlich höher waren als nach kombinierter Behandlung von Progesteron und hCG, was zu einem deutlich höheren Standardfehler führte.

Zur Untersuchung der FOXO1-Expression auf Proteinebene in den ektopen humanen endometrialen Fragmenten nach 10tägiger Behandlung und Kultur in NOD-SCID-Mäusen wurde ein immunhistochemischer Nachweis durchgeführt (Abb. 18A-C). Vehikelfragmente zeigten keine Expression von FOXO1 (Abb. 18A). Nach Behandlung mit hCG in Kombination mit Progesteron bzw. MPA war eine großflächige nukleäre Expression von FOXO1 in den dezidualisierten Stomazellen zu erkennen (Abb. 18BC). Die semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen zeigte eine signifikante Erhöhung der FOXO1-Expression im Vergleich zur Vehikelkontrolle in den ektopen Fragmenten, welche mit Progesteron bzw. MPA und hCG behandelt wurden (Abb. 18). Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verschiedenen Gestagenen.

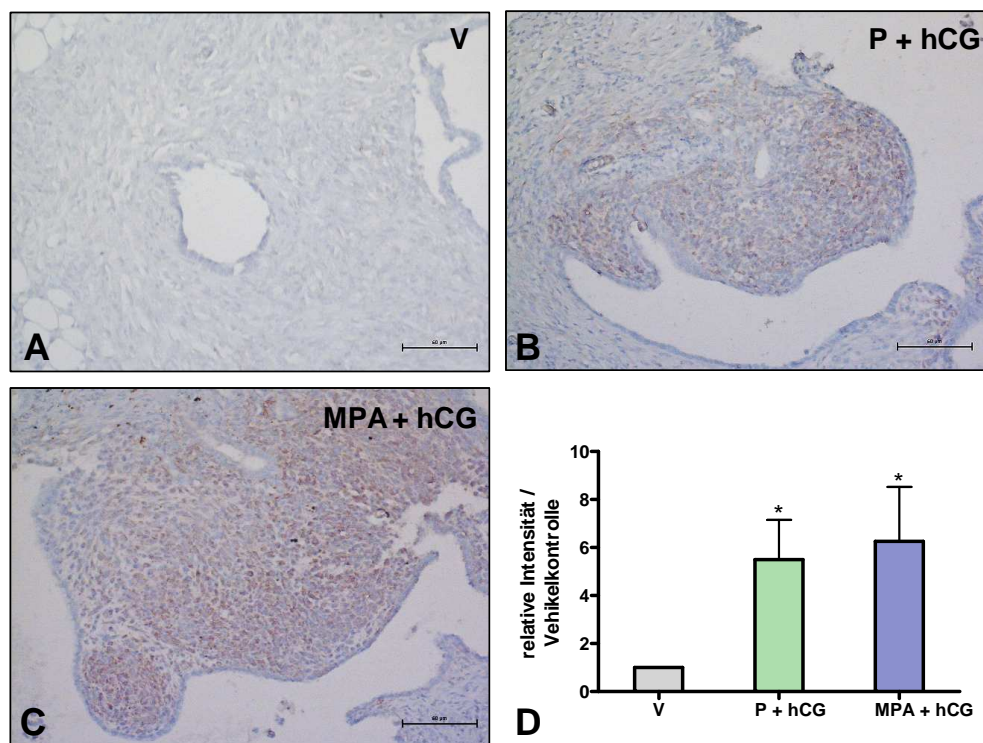


Abb. 18: Immunhistochemischer Nachweis der FOXO1-Expression

FOXO1-Expression nach Kultivierung in unbehandelten (A), mit Progesteron und hCG (B) und mit MPA und hCG (C) behandelten NOD-SCID-Mäusen nach 10 Tagen Kultur. Balken = 50 µm. (D) Semiquantitative Auswertung der FOXO1-Färbung. Pro Behandlungsgruppe wurden fünf Fragmente analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. Die relative Intensität des Vehikelfragmentes wurde gleich 1 gesetzt. * $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Vehikelkontrolle. V = Vehikel; P = Progesteron; MPA = Medroxyprogesteronacetat; hCG = humanes Choriongonadotropin.

Im Hinblick auf die Expression von *GJA1* zeigte sich nach 10tägiger kombinierter Behandlung von hCG mit Progesteron bzw. MPA keine Steigerung der Transkription im

Vergleich zur Kontrolle (Abb. 19A). Es zeigte sich jedoch eine gesteigerte GJA1-Proteinexpression in den unterschiedlich behandelten ektopen humanen endometrialen Läsionen, die aber nicht signifikant war (Abb. 19BC). Die immunhistochemische Analyse der GJA1-Expression zeigte in den Kontrollfragmenten vereinzelt Zellen, die an der Membran eine Expression von GJA1 aufwiesen (Abb. 19D). Nach kombinierter Behandlung mit hCG und Progesteron (Abb. 19E) bzw. MPA (Abb. 19F) waren die Membranen fast aller Stromazellen der jeweiligen Fragmente angefärbt. Durch diesen immunhistochemischen Nachweis der GJA1-Expression konnte gezeigt werden, dass der im Western Blot gezeigte Anstieg der Proteinexpression auf einer gesteigerten Expression von GJA1 im Stroma beruht.

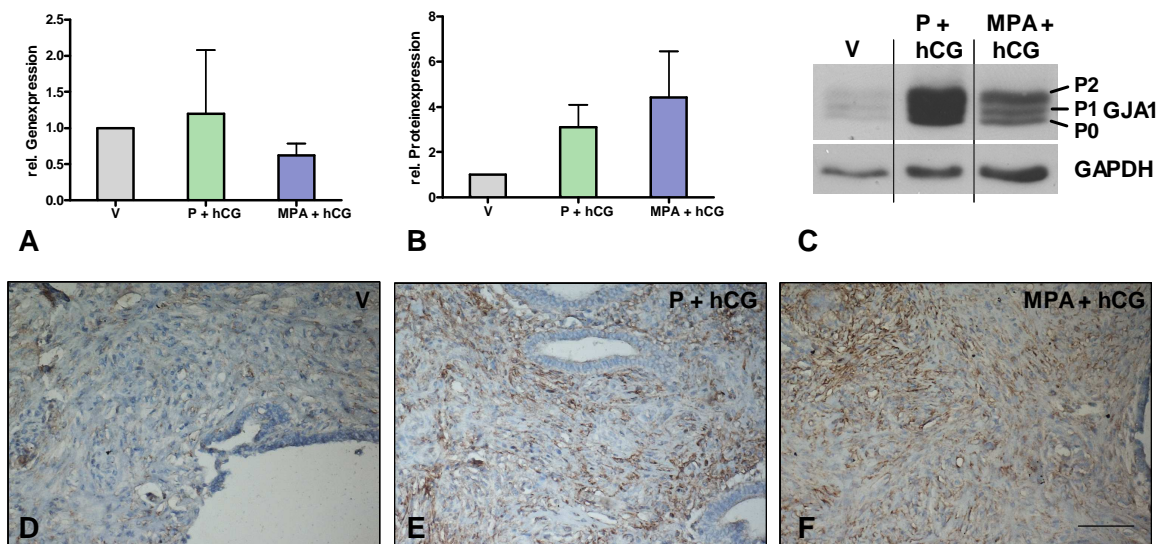


Abb. 19: Expressionsanalyse von GJA1

Expression von GJA1 in ektopen humanen endometrialen Fragmenten fünf verschiedener Patientinnen nach 10tägiger Kultur in NOD-SCID Mäusen. (A) Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert \pm Standardfehler der Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR zur *GJA1*-Expression. Es wurde gegen das entsprechende *ACTB*-Signal abgeglichen. Die relative Prolaktinexpression des Vehikelfragmentes wurde gleich 1 gesetzt und die x-fache Expression im Substanz behandelten Tier entsprechend bestimmt. (B) Densitometrische Auswertung von Western Blots zur GJA1-Expression. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der verschiedenen Messungen, die gegen das entsprechende GAPDH-Signal abgeglichen worden sind. (C) Repräsentativer Western Blot. P0-P2 = unterschiedliche Phosphorylierungsstadien von GJA1 (P0 = 41 kDa, P1 = 44 kDa, P2 = 46 kDa). (D-F) Immunhistochemischer Nachweis der GJA1-Expression nach Kultivierung in unbehandelten (D), mit Progesteron und hCG (E) und MPA und hCG (F) behandelten NOD-SCID-Mäusen nach 10 Tagen Kultur. Balken = 50 μ m. V = Vehikel; P = Progesteron; MPA = Medroxyprogesteronacetat; hCG = humanes Choriongonadotropin.

Die CD82-Expression wurde auf Proteinebene immunhistochemisch analysiert und quantifiziert. Die ektopen endometrialen Gewebefragmente aus den Kontrolltieren wiesen

keine Membranfärbung für CD82 auf (Abb. 20A). Nach Behandlung mit hCG in Kombination mit Progesteron bzw. MPA war eine Expression von CD82 an den Zellmembranen der Stromazellen zu beobachten (Abb. 20BC). Die semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen ergab eine tendenzielle Erhöhung der CD82-Expression im Vergleich zur Vehikelkontrolle nach Behandlung mit hCG in Kombination mit beiden Gestagenen (Abb. 20D).

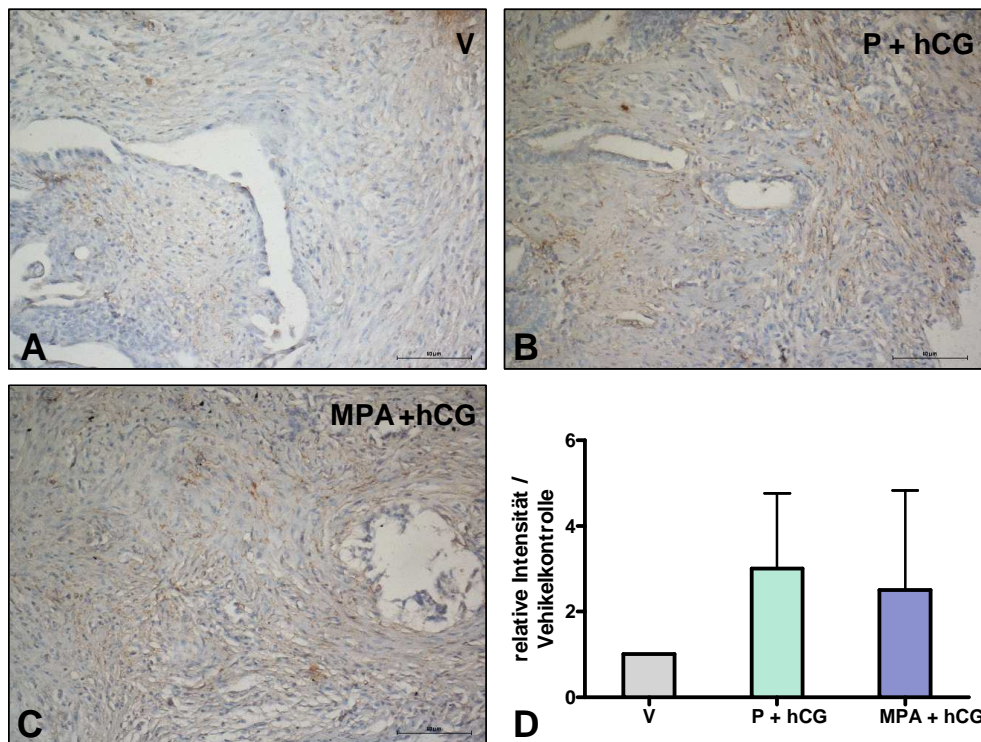


Abb. 20: Immunhistochemischer Nachweis der CD82-Expression

CD82-Expression nach Kultivierung in unbehandelten (A), mit Progesteron und hCG (B) und mit MPA und hCG (C) behandelten NOD-SCID-Mäusen nach 10 Tagen Kultur. Balken = 50 µm. (D) Semiquantitative Auswertung der CD82-Färbung. Pro Behandlungsgruppe wurden fünf Fragmente analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. Die relative Intensität des Vehikelfragmentes wurde gleich 1 gesetzt. V = Vehikel; P = Progesteron; MPA = Medroxyprogesteronacetat; hCG = humanes Choriongonadotropin.

3.3.2.4 Proliferation der ektopen humanen endometrialen Läsionen

Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen des Proliferationsmarkers Ki-67 zeigte eine tendenziell reduzierte Proliferationsrate des Stromas der für 10 Tage mit Progesteron und hCG behandelten endometrialen Fragmente sowie eine abgesenkte Proliferationsrate der Drüsenepithelzellen bei der Kombination von

hCG mit beiden Gestagenen im Vergleich zur Vehikelkontrolle (Abb. 21). Diese Unterschiede waren aber nicht signifikant.

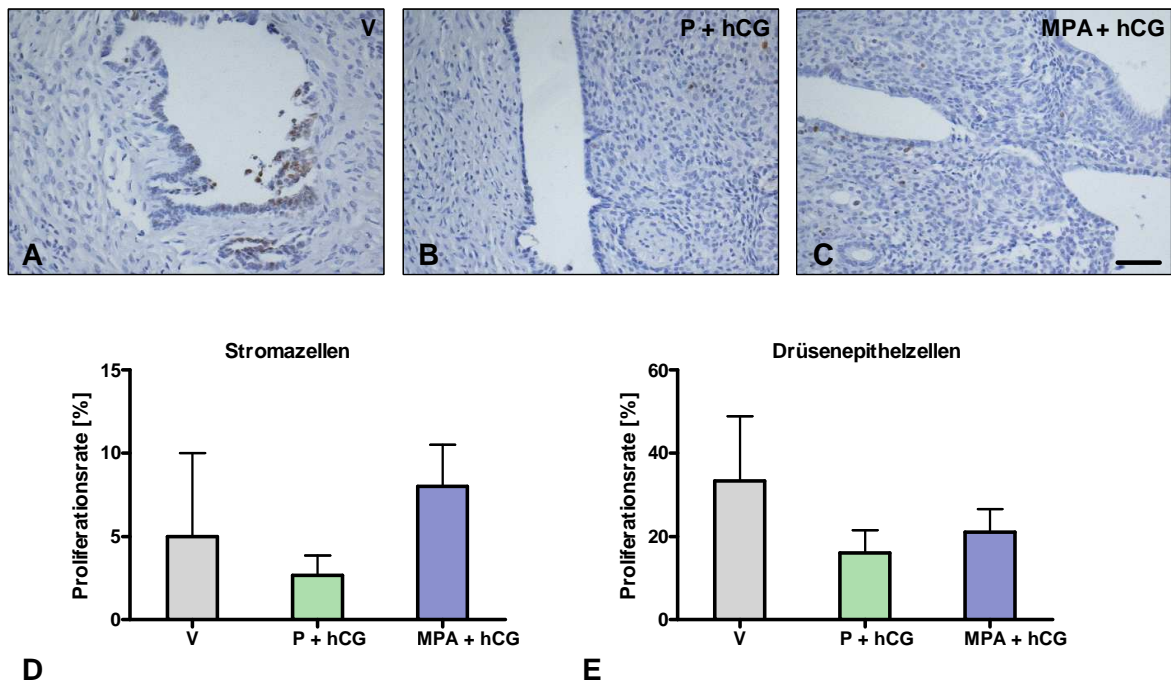


Abb. 21: Proliferation der ectopen Läsionen

Nachweis der Proliferation humaner endometrialer Fragmente nach Kultivierung in der NOD-SCID Maus über 10 Tage unter Behandlung verschiedener Substanzen. (A-C) Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki-67. Die Zellkerne proliferierender Zellen sind braun gefärbt. Es wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt. (A) Vehikel; (B) Progesteron und hCG; (C) MPA und hCG. Balken: = 40 μ m. Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung der Stromazellen (D) sowie Drüsenepithelzellen (E). Pro Behandlungsgruppe wurden vier Fragmente analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. V = Vehikel; P = Progesteron; MPA = Medroxyprogesteronacetat; hCG = humanes Choriongonadotropin.

3.4 Entzug von Dezidualisierungsinduktoren

Wie zuvor beschrieben wird diskutiert, dass Endometrioseherde während einer Schwangerschaft dezidualisieren und nach der Geburt apoptotisch werden können (Moen und Muus, 1991). Für Letzteres könnte der Entzug von Progesteron verantwortlich sein (Healy und Hodgen, 1983). Aus diesem Grund wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der nach 10 Tagen die Behandlung zur Induktion der Dezidualisierung der in NOD-SCID-Mäuse transplantierten humanen endometrialen Fragmente beendet und die Kultur für weitere 7 Tage ohne Behandlung fortgesetzt wurde. Nach diesem Zeitraum wurden die

Fragmente analysiert. Da sich in den vorangegangenen Versuchen gezeigt hatte, dass die stärkste Induktion der Dezidualisierung mit Progesteron in Kombination mit hCG erreicht werden konnte, wurde diese Behandlung für die folgenden Versuche eingesetzt. Für jeden Versuch wurde das Gewebe derselben Patientin parallel in zwei NOD-SCID-Mäuse transplantiert. Einer dieser Mäuse wurde Progesteron (50 µg/d) + hCG (7,5 IU/d) appliziert. Die zweite Maus diente als Vehikelkontrolle. Die Substanzapplikation erfolgte über einen Zeitraum von 10 Tagen. Nach einem Zeitraum von 17 Tagen wurden die endometrialen Gewebefragmente entnommen und aufgearbeitet.

3.4.1 Effekt auf das Uterusgewicht der Maus

Um die Wirkung der applizierten Substanzen auf den Uterus als Zielorgan zu überprüfen, wurden auch bei dieser Versuchsreihe die Uterusgewichte der Mäuse nach Beendigung des Versuches ermittelt (Abb. 22). Zwar zeigte sich ein erhöhtes Uterusgewicht nach der Behandlung mit Progesteron und hCG, jedoch war dies nicht signifikant.

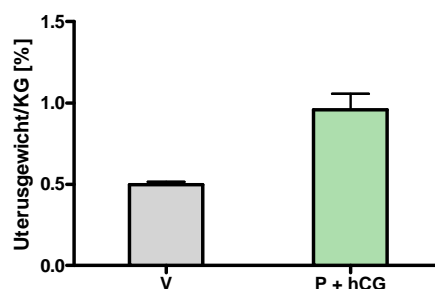


Abb. 22: Uterusgewichte der NOD-SCID Mäuse nach Behandlung

Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler der Uterusgewichte als prozentualer Anteil am Körpergewicht (KG) nach Kultivierung und Behandlung in NOD-SCID Mäusen. V = Vehikel; P = Progesteron; hCG = humanes Choriongonadotropin.

3.4.2 Effekt auf die humanen ektopen endometrialen Läsionen

3.4.2.1 Größe und Gewicht der ektopen humanen endometrialen Läsionen

Nach 17 Tagen wurden den Mäusen die endometrialen Gewebefragmente entnommen und deren Gewicht und Größe bestimmt. Während sich nach 10tägiger Behandlung eine leichte Erhöhung des Gewichtes gezeigt hatte (vgl. Abb. 15), war nach weiteren 7 Tagen ohne Behandlung kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle zu beobachten (Abb. 23).

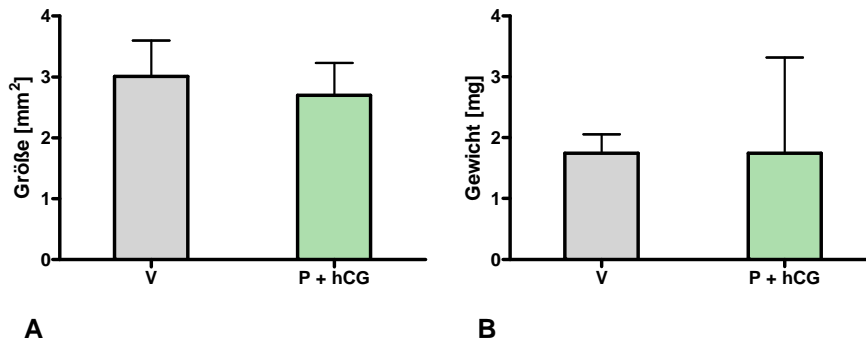


Abb. 23: Wachstumsverhalten der ektopen Läsionen

Größe (A) und Gewicht (B) der humanen endometrialen Fragmente dreier verschiedener Patientinnen nach 10tägiger Kultur und Behandlung in NOD-SCID Mäusen und weiterer 7tägiger Kultur ohne Behandlung. Pro Behandlungsgruppe wurden 12 Fragmente analysiert. Gewicht und Größe sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. V = Vehikel; P = Progesteron; hCG = humanes Choriongonadotropin.

3.4.2.2 Morphologie der ektopen humanen endometrialen Läsionen

Nach einer 10tägigen Behandlung mit Progesteron und hCG gefolgt von 7 Tagen ohne Behandlung wurden die ektopen humanen endometrialen Läsionen histomorphologisch untersucht. Während in den Kontrollfragmenten nur kleine Areale dezidualisierter Zellen zu erkennen waren (Abb. 24A), zeigten sich in den behandelten Läsionen deutlich größere dezidualisierte Areale (Abb. 24B). Die morphometrische Auswertung dieser Areale zeigte, dass die Gesamtfläche dezidualisierten Stromas im Vergleich zur Kontrolle erhöht war (Abb. 24C). Im Gegensatz zu den unter 3.3.2.2 beschriebenen Versuchen, bei denen nach einer 10tägigen Behandlung mit Progesteron und hCG ein signifikanter Anstieg der dezidualisierten Fläche beobachtet wurde (vgl. Abb. 16), war dieser Anstieg nach weiteren 7 Tagen Kultur ohne Behandlung nicht mehr signifikant.

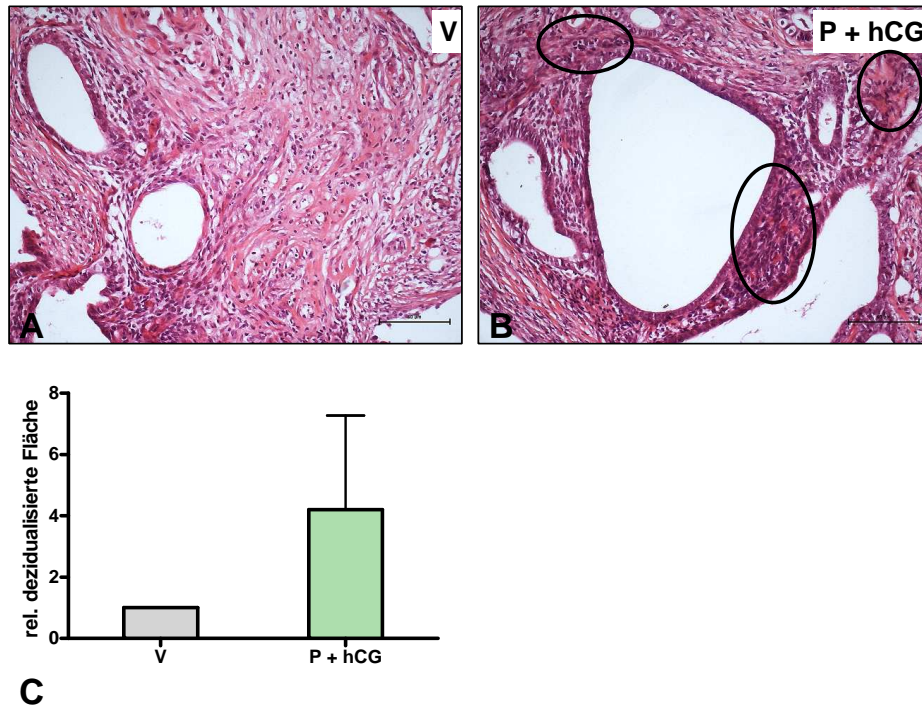


Abb. 24: Histomorphologische Analyse der ectopen Läsionen

Histomorphologie humaner endometrialer Fragmente nach 10tägiger Kultur in NOD-SCID Mäusen, die mit Progesteron und hCG bzw. dem Vehikel behandelt wurden und weiterer 7tägiger Kultur ohne Behandlung. (A) Vehikelkontrolle, (B) Behandlung mit Progesteron und hCG. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und zeigen charakteristische Strukturen endometrialen Gewebes. Balken = 50 μ m. (C) Morphometrische Quantifizierung dezidualisierter Areale. Pro Behandlungsgruppe wurden drei Fragmente analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. Der prozentuale Anteil der dezidualisierten Fläche an der Gesamtfläche des Vehikelfragmentes wurde gleich 1 gesetzt und die x-fache Fläche im Substanz behandelten Tier entsprechend bestimmt. V = Vehikel; P = Progesteron; hCG = humanes Choriongonadotropin.

3.4.2.3 Expression von Dezidualisierungsmarkern in den ectopen humanen endometrialen Läsionen

Der Grad der Dezidualisierung in den ectopen endometrialen Fragmenten wurde nach 17tägiger Kultur in NOD-SCID-Mäusen wie in den vorhergehenden Versuchsreihen mit Hilfe verschiedener Dezidualisierungsmarker analysiert.

In Abb. 25 sind die Ergebnisse der quantitativen PCR für *dPRL* und *FOXO1* in den ectopen humanen endometrialen Fragmenten von drei verschiedenen Patientinnen nach 10tägiger Behandlung und weiterer 7tägiger Kultur ohne Behandlung in NOD-SCID-Mäusen dargestellt. Die signifikante Erhöhung der *dPRL*-Expression, die bereits in der vorhergehenden Versuchsreihe nach 10tägiger kombinierter Behandlung mit Progesteron

und hCG gezeigt wurde (vgl. Abb. 17A), stieg nach 10tägiger Behandlung mit Progesteron und hCG und anschließender 7tägiger Kultur ohne Behandlung in den ektopen endometrialen Fragmenten nochmals deutlich an (Abb. 25A). Im Gegensatz hierzu zeigte sich im Hinblick auf die Expression des Dezidualisierungsmarkers *FOXO1* kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (Abb. 25B).

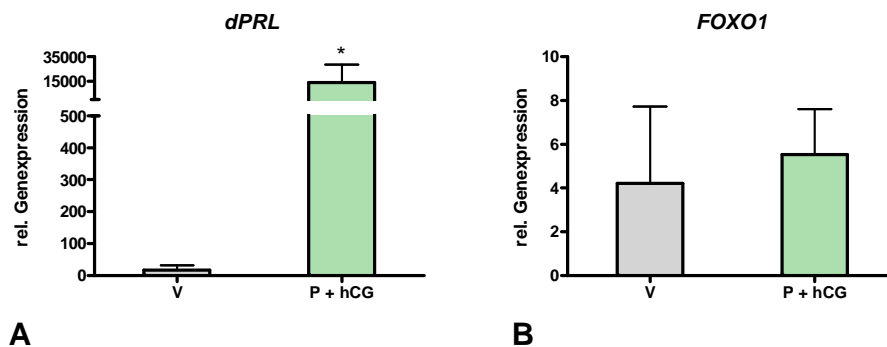


Abb. 25: Relative Expression von *dPRL* und *FOXO1* auf Transkriptionsebene

Relative Genexpression von *dPRL* (A) und *FOXO1* (B) in ektopen humanen endometrialen Fragmenten nach 10tägiger bzw. 17tägiger Kultur in NOD-SCID Mäusen. Dargestellt sind die Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR ektoper Fragmente dreier Patientinnen als Mittelwert \pm Standardfehler. Es wurde gegen das entsprechende *ACTB*-Signal abgeglichen. Die *dPRL*-Expression ist nach kombinierter Behandlung mit Progesteron und hCG signifikant hochreguliert ($* \leq 0,05$). V = Vehikel; P = Progesteron; hCG = humanes Choriongonadotropin.

Auf Proteinebene zeigten die Kontrollen nach 17tägiger Kultur in NOD-SCID-Mäusen eine schwache Expression von FOXO1 in der immunhistochemischen Untersuchung (Abb. 26A). Eine solche Expression war in den vorhergehenden Versuchsreihen nach kürzerer Kulturdauer in den endometrialen Kontrollfragmenten nicht zu beobachten (vgl. Abb. 8A und Abb. 18A). Nach 10tägiger Behandlung mit Progesteron und hCG und anschließender 7tägiger Kultur ohne Behandlung in der NOD-SCID-Maus wiesen größere Bereiche der ektopen Fragmente eine Expression von FOXO1 in den endometrialen Stromazellen auf (Abb. 26B). Die semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Fragmenten (Abb. 26C).

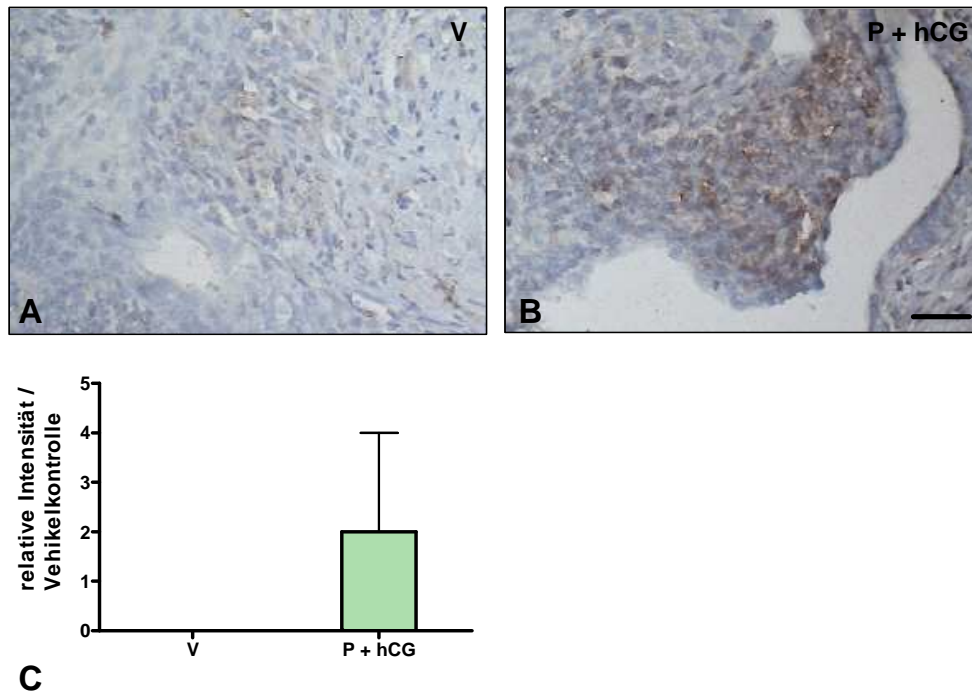


Abb. 26: Immunhistochemischer Nachweis der FOXO1-Expression

FOXO1-Expression nach Kultivierung in unbehandelten (A) und mit Progesteron und hCG behandelten (B) NOD-SCID-Mäusen nach 17 Tagen Kultur. Balken = 40 μ m. (D) Semiquantitative Auswertung der FOXO1-Färbung. Pro Behandlungsgruppe wurden drei Fragmente analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. V = Vehikel; P = Progesteron; hCG = humanes Choriongonadotropin.

Die Transkription von *GJA1* unterschied sich nach 10tägiger kombinierter Behandlung mit Progesteron und hCG und nachfolgender 7tägiger Kultur ohne Behandlung nicht signifikant von der Kontrolle (Abb. 27).

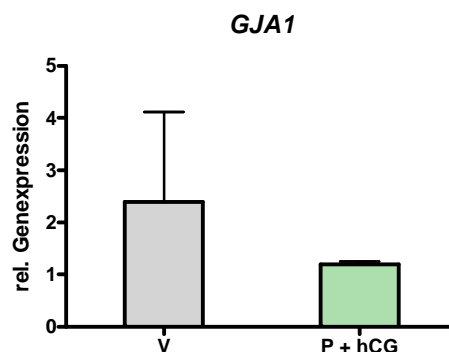


Abb. 27: Relative Expression von *GJA1* auf Transkriptionsebene

Relative Genexpression von *GJA1* in ektopen humanen endometrialen Fragmenten drei verschiedener Patientinnen nach 17tägiger Kultur in NOD-SCID Mäusen. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert \pm Standardfehler der Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR. Es wurde gegen das entsprechende *ACTB*-Signal abgeglichen. V = Vehikel; P = Progesteron; hCG = humanes Choriongonadotropin.

Eine leichte Erhöhung der GJA1-Proteinexpression, wie sie in der Western Blot-Analyse nach 10tägiger Behandlung mit Progesteron und hCG in den ektopen humanen endometrialen Läsionen gezeigt wurde (vgl. Abb. 19B), blieb auch nach weiteren 7 Tagen Kultur ohne Behandlung erhalten, war jedoch nicht signifikant (Abb. 28A). Eine stärkere GJA1-Proteinexpression zeigte sich auch in den behandelten ektopen Fragmenten nach 17tägiger Kultur im Vergleich zur Kontrolle in der immunhistochemischen Analyse (Abb. 28C).

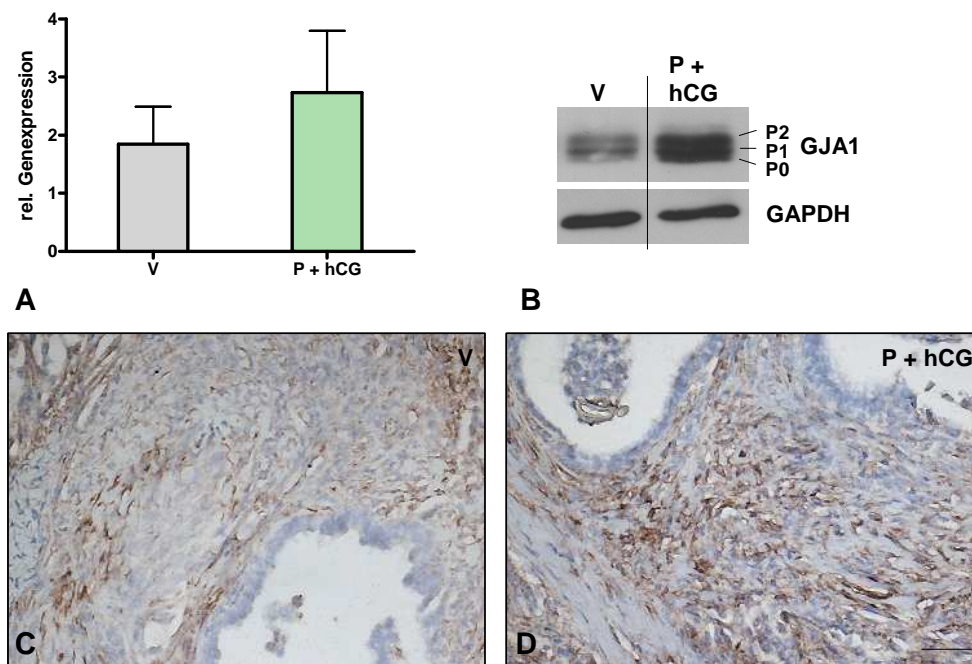


Abb. 28: Expressionsanalyse von GJA1 auf Proteinebene

Expression von GJA1 in ektopen humanen endometrialen Fragmenten drei verschiedener Patientinnen nach 17tägiger Kultur in NOD-SCID Mäusen. **(A)** Densitometrische Auswertung von Western Blots zur GJA1-Expression. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der verschiedenen Messungen, die gegen das entsprechende GAPDH-Signal abgeglichen worden sind. **(B)** Repräsentativer Western Blot. P0-P2 = unterschiedliche Phosphorylierungsstadien von GJA1 (P0 = 41 kDa, P1 = 44 kDa, P2 = 46 kDa). **(C,D)** Immunhistochemischer Nachweis der GJA1-Expression nach Kultivierung in unbehandelten **(C)** und Progesteron und hCG behandelten **(D)** NOD-SCID-Mäusen nach 17 Tagen Kultur. Balken = 40 µm. V = Vehikel; P = Progesteron; hCG = humanes Choriongonadotropin.

Die immunhistochemische Analyse der CD82-Expression zeigte in den Kontrollfragmenten nur wenige Zellen, die an der Membran eine Expression von CD82 aufwiesen (Abb. 29A). Nach kombinierter Behandlung von Progesteron und hCG waren die Membranen fast aller Stromazellen in den ektopen endometrialen Fragmenten angefärbt (Abb. 29B). Die semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen

Färbungen ergab einen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten Fragmenten (Abb. 29C).

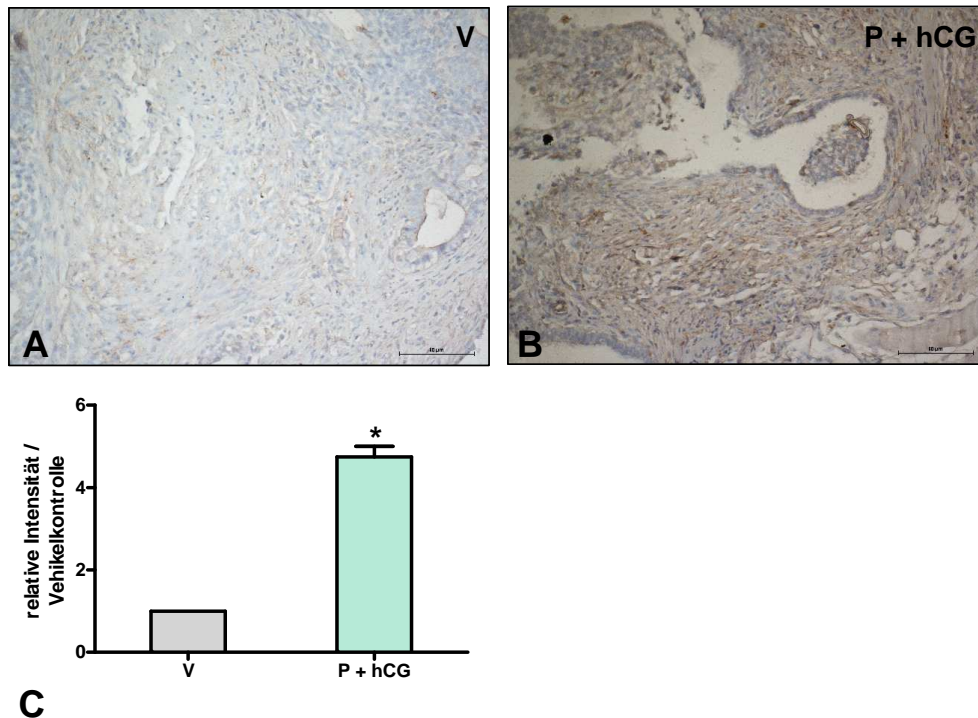


Abb. 29: Immunhistochemischer Nachweis der CD82-Expression

CD82-Expression nach Kultivierung in unbehandelten (A) und für 10 Tage mit Progesteron und hCG behandelten (B) NOD-SCID-Mäusen nach 17 Tagen Kultur. Balken = 50 µm. (C) Semiquantitative Auswertung der CD82-Färbung. Pro Behandlungsgruppe wurden drei Fragmente analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. Die relative Intensität des Vehikelfragmentes wurde gleich 1 gesetzt. * $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Vehikellkontrolle. V = Vehikel; P = Progesteron; hCG = humanes Choriongonadotropin.

3.4.2.4 Proliferation der ektopen humanen endometrialen Läsionen

Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen für Ki-67 (Abb. 30) ergab für das Stroma sowie das Drüsenepithel der für 10 Tage mit Progesteron und hCG behandelten und für weitere 7 Tage ohne Behandlung in NOD-SCID-Mäusen kultivierten ektopen endometrialen Fragmente eine im Vergleich zur Vehikellkontrolle signifikant reduzierte Proliferationsrate des endometrialen Stromas (Abb. 30C), während die Proliferation der Drüsenepithelzellen nur leicht reduziert war (Abb. 30D).

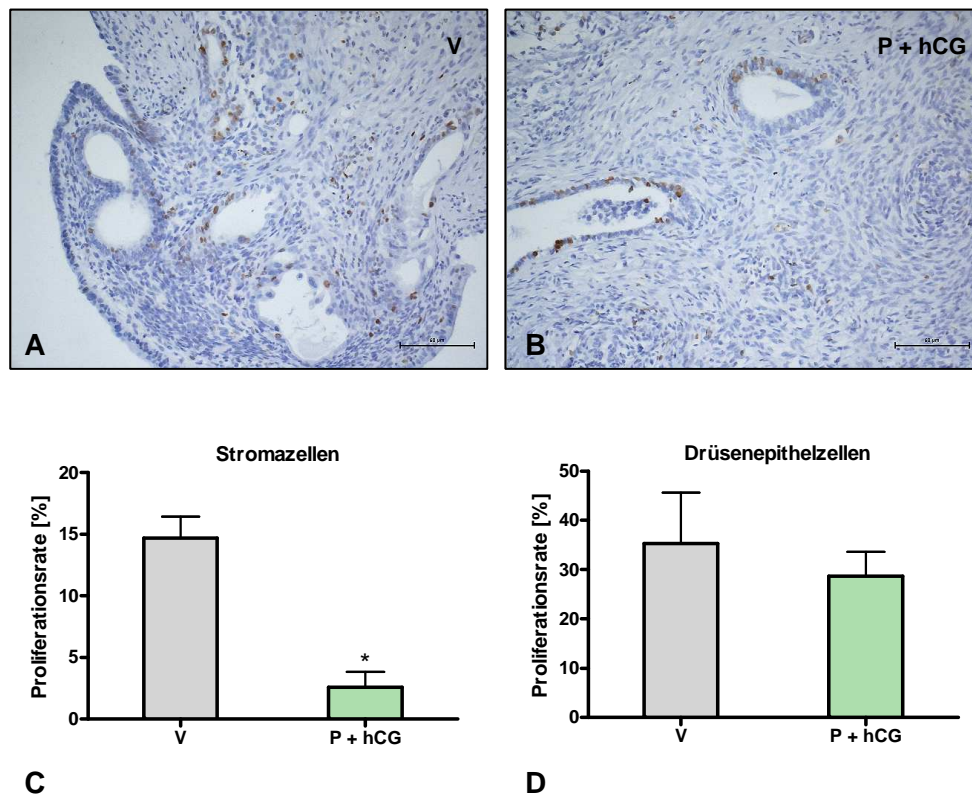


Abb. 30: Proliferation der ectopen Läsionen

Nachweis der Proliferation humaner endometrialer Fragmente nach 10tägiger Behandlung Progesteron und hCG gefolgt von einer 7tägigen Kultivierung ohne Behandlung in der NOD-SCID Maus. (AB) Immunhistochemien mit einem Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki-67. Die Zellkerne proliferierender Zellen sind braun gefärbt. Es wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt. (A) Vehikel; (B) Progesteron + hCG. Balken: = 50 μ m. Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung der Stromazellen (C) sowie Drüsenepithelzellen (D). Pro Behandlungsgruppe wurden Fragmente von vier verschiedenen Patientinnen analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. Die Proliferationsrate der Stromazellen ist nach 10tägiger kombinierter Behandlung von Progesteron und hCG und weiterer 7tägiger Kultur im Vergleich zur Vehikelkontrolle signifikant reduziert (* $\leq 0,05$). V = Vehikel; P = Progesteron; hCG = humanes Choriongonadotropin.

3.5 Einfluss der verschiedenen Behandlungen auf die Apoptoserate von ectopen endometrialen Läsionen

In den vorhergehenden Kapiteln konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die Dezidualisierung ectopen endometrialen Gewebes *in vivo* zu induzieren. Die nächste zu untersuchende Frage wäre, ob diese dezidualisierten Stromazellen mit der Zeit apoptotisch werden und somit ein Persistieren der ectopen endometrialen Fragmente *in vivo* verhindert werden kann. Daher wurden zur Untersuchung von Apoptoseparametern Paraffinschnitte

der humanen Endometriumfragmente aller Versuchsreihen mit einem Antikörper gegen die aktivierte Caspase 3, ein Mitglied in der Apoptosesignalkaskade, inkubiert.

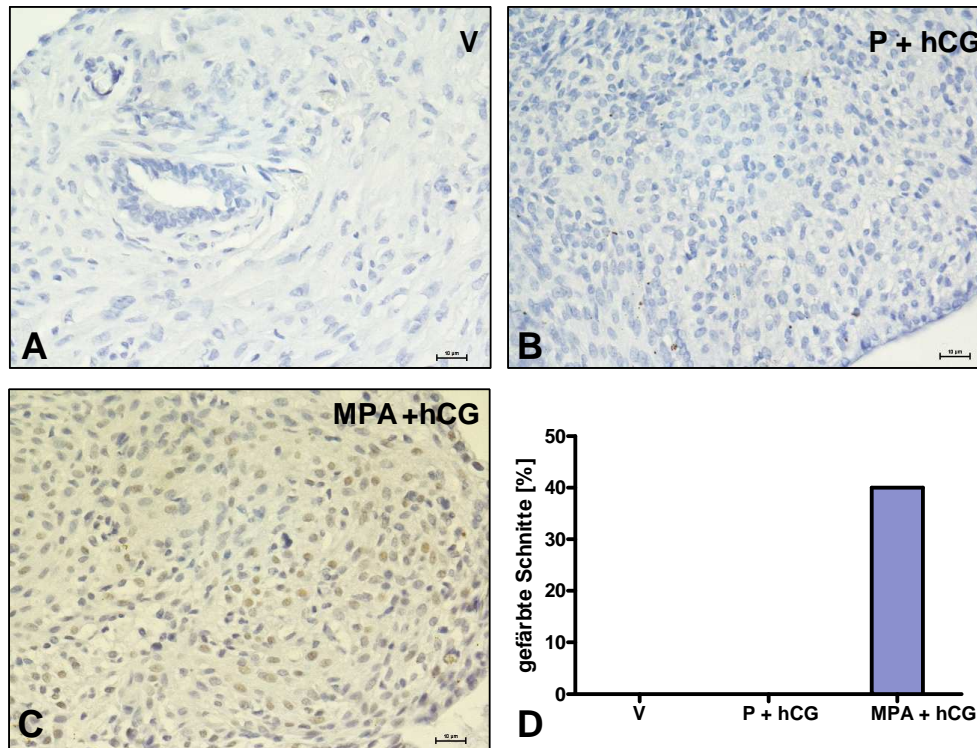


Abb. 31: Nachweis aktivierter Caspase 3

Immunhistochemischer Nachweis der aktivierten Caspase 3 in unbehandelten (A), mit P und hCG (B) und mit MPA und hCG (C) behandelten humanen ektopen endometrialen Läsionen nach 10 Tagen Kultur in NOD-SCID-Mäusen. Apoptotische Zellkerne sind braun gefärbt. Balken = 10 µm. (D) Quantitative Darstellung des immunhistochemischen Nachweises von aktivierter Caspase 3. V = Vehikel; P = Progesteron; MPA = Medroxyprogesteronacetat; hCG = humanes Choriongonadotropin.

Nach 7tägiger Behandlung mit Progesteron alleine oder in Kombination mit Forskolin bzw. hCG konnte keine spezifische Färbung der Zellkerne für aktivierte Caspase 3 festgestellt werden. Ebenso konnte nach 10tägiger Behandlungsdauer mit Progesteron und hCG (Abb. 31B) sowie nach Entzug dieser Dezidualisierungsinduktoren, d.h. nach 10tägiger Behandlung und anschließender Kultivierung der ektopen Fragmente für einen Zeitraum von sieben Tagen, keine Apoptose in den ektopen endometrialen Läsionen ausgelöst werden. In den unbehandelten Fragmenten aller Versuchsreihen wurde keine spezifische Färbung der Zellkerne für aktivierte Caspase 3 gefunden (Abb. 31A). Interessanterweise waren nach 10tägiger Behandlung mit MPA und hCG in den ektopen endometrialen Fragmenten große Areale zu beobachten, in denen die Zellkerne der dezidualisierten Stromazellen, nicht aber der Drüsenepithelzellen, eine Färbung für

aktivierte Caspase 3 aufwiesen (Abb. 31CD). Jedoch war eine Expression von aktivierter Caspase 3 nur in den mit MPA und hCG behandelten Gewebefragmenten aus Patientinnen zu erkennen, die auch schon in den vorhergehenden Analysen der Dezidualisierungsmarker die stärkste Reaktion auf die Induktion der Dezidualisierung zeigten.

4 Diskussion

4.1 Induktion der Dezidualisierung ektopen Endometriums *in vivo*

Es wird davon ausgegangen, dass die stromale Komponente des Endometriums eine wesentliche Rolle bei der Etablierung und Persistenz der Endometriose spielt (Nisolle et al., 2000a). Ein möglicher therapeutischer Ansatz zur Behandlung der Endometriose könnte daher darin liegen, durch eine Induktion der Dezidualisierung der endometriotischen Stromazellen diese Zellen terminal zu differenzieren und damit die Überlebensdauer zu terminieren. Normalerweise sind die meisten menstruellen Zellen terminal differenziert und zeigen daher eine reduzierte Kapazität zu ektooper Invasion und Östrogen-vermitteltem Wachstum (Bruner-Tran et al., 2006). Scott und Te Linde (1954) konnten im Tiermodell zeigen, dass die Transplantation von operativ entnommenem humanem Endometrium aus der Proliferationsphase des Menstruationszyklus sich am erfolgreichsten darstellt. Endometriales Gewebe aus der Sekretions- und prämenstruellen Phase ist weniger erfolgreich zu transplantieren und die Transplantationsfähigkeit reduziert sich weiterhin bei dezidualisiertem Gewebe mit der Dauer einer Schwangerschaft, so dass das stark dezidualisierte Gewebe am Ende der Schwangerschaft kaum mehr zu transplantieren ist (Scott and Te Linde, 1954). Die Theorie einer nichtadäquaten Differenzierung des eutopen Endometriums bei erkrankten Frauen wird durch die Tatsache unterstützt, dass Endometriose in fast 60% der Patientinnen mit Infertilität verbunden ist (Grummer et al., 2001; Ledger, 1999). Ein Abbau des endometrialen Stromas könnte die für das Wachstum der endometriotischen Läsionen notwendige Interaktion zwischen dem stromalen und epithelialen Kompartiment beeinflussen (Cunha et al., 1980, 1985; Osteen et al., 1994; Nisolle et al., 2000b). Nisolle et al. (2000) und Grummer et al. (2001) konnten zeigen, dass epitheliale Zellen ihre ursprüngliche Morphologie nur in Bereichen beibehalten, in denen das Stroma stark entwickelt ist. Ohne endometriales Stroma, welches die Drüsen umgibt, atrophiert auch das Drüsenepithel (Bergqvist et al., 1985a). Diese Beobachtung bildet u.a. die Grundlage der therapeutischen Verwendung kontinuierlich eingesetzter hochdosierter Progestine (Kistner, 1958; Metzger und Haney, 1988). In 77% der endometriotischen Läsionen schwangerer Frauen wurde bei einer Studie eine Dezidualisierung gefunden (Moen und Muus, 1991). In experimentellen Studien mit operativ induzierter Endometriose in Affen konnte eine vollständige oder deutliche Regression der Implantate nach der Geburt demonstriert werden (Schenken et al., 1987).

Jedoch wurde schon 1965 beschrieben, dass eine histologische Regression endometriotischer Läsionen nicht durchweg in der Schwangerschaft beobachtet wurde (McArthur und Ulfelder, 1965).

Da aus zahlreichen *in vitro*-Studien bekannt ist, dass die Gabe von Progestinen in Kombination mit cAMP zu einer verstärkten Dezidualisierung von humanen endometrialen Stromazellen im Vergleich zu der Behandlung mit Progestinen alleine führt (Kim et al., 1998; Gellersen und Brosens, 2003; Tsuno et al., 2009), wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig versucht, die Dezidualisierung auch in humanen ektopen endometrialen Läsionen *in vivo* durch die zusätzliche Aktivierung des cAMP/PKA-Signalweges hervorzurufen bzw. zu verstärken. Als Substanzen, die den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen, wurde zum einen Forskolin appliziert, das eine direkte Aktivierung der Adenylatzyklase bewirkt, zum anderen das heterodimere Glykoproteinhormon hCG, das den cAMP-Anstieg über die Bindung an G-Protein-gekoppelte LH/hCG (Luteinisierendes Hormon /Choriongonadotropin)-Rezeptoren und nachfolgend in einem Rezeptor-abhängigen Prozess die Aktivierung der α -Untereinheit des trimeren G-Proteins hervorruft, welches dann die katalytische Aktivität der Adenylatzyklase auslöst (Weedon-Fekjaer und Tasken, 2012). Als Maß für die Dezidualisierung wurden die morphologischen und biochemischen Änderungen des endometrialen Stromas herangezogen. Die stromalen Fibroblasten differenzieren zu runden, großen epitheloiden sezernierenden Deziduazellen. Spezifische biochemische Marker dieser Transformation endometrialer Stromazellen sind PRL und IGFBP-1 (Tseng et al., 1992; Gellersen und Brosens, 2003). Anhand dieser Parameter konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Dezidualisierung ektopen endometrialen Gewebes signifikant durch die Applikation von Progesteron und hCG induziert werden kann, während die Behandlung mit Progesteron alleine keinen und die Kombination von Progesteron und Forskolin einen deutlich schwächeren Effekt zeigte. Dieser signifikante Effekt einer kombinierten Behandlung mit Progesteron und hCG verstärkte sich mit der Behandlungsdauer. Während nach 7tägiger Behandlung ein 20fach erhöhtes Expressionslevel von *dPRL* erreicht wurde, war das Transkriptlevel von *dPRL* im Vergleich zur Kontrolle nach 10 tägiger kombinierter Behandlung mit Progesteron und hCG nun beinahe 100fach erhöht. Es konnte zuvor schon gezeigt werden, dass Progesteron nur ein schwacher Induktor der Dezidualisierung ist und zudem eine längere Dauer der Progesteronwirkung nötig ist. So wird auch die deziduale Umformung der eutopen stromalen Zellen beim Menschen erst ungefähr zehn Tage nach dem postovulatorischen Anstieg des ovariellen Progesteronlevels zunächst um die Spiralarterien herum sichtbar (de

Ziegler et al., 1998). In *in vitro*-Studien wurde festgestellt, dass eine 2wöchige Behandlung humaner endometrialer Stromazellen notwendig ist, um die Dezidualisierung durch die alleinige Gabe von Progesteron zu induzieren (Mizuno et al., 1998). Die Ergebnisse der oben aufgeführten Studien deuten darauf hin, dass die Expression der Dezidua-spezifischen Gene wahrscheinlich nicht unter der direkten transkriptionellen Kontrolle des aktivierten Progesteronrezeptors liegt, sondern die Interaktion des nukleären Progesteronrezeptors mit anderen Transkriptionsfaktoren den Progesteroneffekt im differenzierenden endometrialen Stroma vermittelt (Tseng et al., 1992; Gellersen und Brosens, 2003). Dafür spricht auch die Tatsache, dass viele Dezidua-spezifischen Gene, darunter das deziduale Prolaktin, keine palindromischen Progesteron-responsiven Elemente in ihren Promotoren besitzen (Gellersen und Brosens, 2003). Der genaue molekulare Mechanismus, über den Progesteron die Differenzierung reguliert, ist noch nicht wirklich verstanden. Es ist bekannt, dass die Dezidualisierung des Endometriums zusätzlich zum Progesteron über weitere Faktoren beeinflusst und gesteuert wird. So kann auch die Stimulierung des cAMP/PKA-Signalweges einen starken Einfluß auf die Dezidualisierung haben (Tseng et al., 1992; Frank et al., 1994; Gellersen und Brosens, 2003). In den letzten Jahren wurde herausgefunden, dass der cAMP/PKA-Signalweg mit dem Progesteronsignalweg interagiert, diesen reguliert und modifiziert (Maruyama und Yoshimura, 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der ektopen Fragmente mit Progesteron und cAMP-steigernden Substanzen zu einer verstärkten Dezidualisierung im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Progesteron führte, wobei hCG ein signifikant besserer Induktor der Dezidualisierung ektopen endometrialen Gewebes war als Forskolin. Es ist bekannt, dass cAMP die transkriptionelle Aktivität des Prolaktinrezeptors verstärkt, obwohl dieser Mechanismus noch nicht ganz verstanden ist (Gellersen und Brosens, 2003). Der Beginn des Dezidualisierungsprozesses benötigt wahrscheinlich einen erhöhten intrazellulären cAMP-Level und eine kontinuierliche Aktivierung des Proteinkinase A (PKA)-Signalweges (Gellersen und Brosens, 2003). Nachdem zwar gezeigt wurde, dass die Zugabe von cAMP oder Forskolin zum Kulturmedium die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen *in vitro* induzieren kann (Sugino et al., 2002; Gellersen und Brosens, 2003), konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die kombinierte Gabe von Progestinen und cAMP-Induktoren auch *in vivo* den Dezidualisierungsprozess der Stromazellen ektopen endometrialen Gewebes verstärken kann. Interessant ist hier vor allen Dingen der von hCG ausgelöste starke Effekt auf die Dezidualisierung. Humanes Choriongonadotropin wird

während der Schwangerschaft vom Trophoblasten gebildet und sezerniert und spielt, neben seiner klassischen endokrinen Funktion zur Aufrechterhaltung der Progesteronproduktion durch den Gelbkörper, eine wichtige Rolle bei der Vorbereitung des Endometriums auf eine Implantation (Tang und Gorpide et al., 1993; Kajihara et al., 2011). Das Endometrium besitzt im Gegensatz zu anderen Geweben, die nicht zum Reproduktionssystem gehören, eine große Menge an LH/hCG-Rezeptoren (Reshef et al., 1990; Han et al., 1997; Gellersen und Brosens, 2003; Prast et al., 2008) und ist während der Schwangerschaft einem hohen Level an hCG ausgesetzt (Maruyama und Yoshimura, 2008). Das Dezidualisierungspotential von hCG zeigt in zahlreichen *in vitro*-Studien widersprüchliche Ergebnisse. Tang und Gorpide (1993) konnten zeigen, dass die Differenzierung primärer endometrialer Stromazellen in Deziduazellen *in vitro* durch urinäres hCG verstärkt wird. Es wurde auch beschrieben, dass hCG die Produktion von dPRL in humanem Deziduagewebe *in vitro* stimuliert (Rosenberg und Bhatnagar, 1984). Demgegenüber steht eine Studie, bei der die morphologische und biochemische Differenzierung primärer humaner endometrialer Stromazellen durch die alleinige Gabe von hCG nicht induziert und der durch Progesteron hervorgerufene Effekt auf die Dezidualisierung durch die zusätzliche Gabe von hCG nicht verstärkt werden konnte, wobei in dieser Veröffentlichung nicht ersichtlich war, welche hCG-Präparation verwendet wurde (Kasahara et al., 2001). Eine kürzlich erschienene Studie berichtet, dass bei Verwendung einer rekombinanten hCG-Präparation die Expression des Dezidualisierungsmarkers dPRL in einer immortalisierten endometrialen Stromazelllinie herunterreguliert werden kann, jedoch die Verwendung von urinärem hCG die Expression steigert (Kajihara et al., 2011). Somit könnten für die widersprüchlichen Ergebnisse der Studien die unterschiedlich verwendeten hCG-Präparationen, rekombinantes versus urinäres hCG, verantwortlich sein. Humanes Choriongonadotropin setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen: Der α -Untereinheit, welche ebenfalls an dem Aufbau der Glykoproteinhormone FSH, LH und TSH (Thyreoida-stimulierendes Hormon) beteiligt ist, und der β -Untereinheit, die dem hCG-Molekül seine biologische Spezifität verleiht (Yarram et al., 2004). In den meisten rekombinanten hCG-Präparationen ist ausschließlich β -hCG enthalten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine natürlich vorkommende Mischung aus hCG-Molekülen mit ihren charakteristischen Glykolisierungseigenschaften und freien α - und β -Untereinheiten verwendet, die aus humanem weiblichem Urin extrahiert wurde. In den verschiedenen urinären hCG-Präparationen kann das Level funktionell intakter hCG-Moleküle und anderer enthaltener hCG-Formen schwanken (Yarram et al., 2004). Es wurde zudem

diskutiert, dass urinäre Präparationen nicht verwendet werden sollten, da diese mit EGF (*epidermal growth factor*) kontaminiert sein könnten und EGF ungewollte zelluläre Reaktionen auslösen kann, auf der anderen Seite bieten urinäre hCG-Präparationen den Vorteil, dass das Hormon in diesen Präparaten über unterschiedliche Modifikationen, wie z.B. Glykosylierungen, verfügt, welche für die biologische Funktion von hCG erforderlich und daher besser für die Untersuchung von *in vivo*-Effekten des Hormons geeignet sind (Saleh et al., 2007). Ein hoher Glykolysierungsgrad von hCG trägt zudem zur Stabilität des Moleküls bei und verlängert somit seine Halbwertszeit (Tsampalas et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich zu den spezifischen Dezidualisierungsmarkern PRL und IGFBP-1 auch die Expression von FOXO-1, GJA1 und CD82 als weitere an der Dezidualisierung beteiligte Faktoren analysiert. Der Transkriptionsfaktor FOXO-1 ist ein früherer Indikator für eine beginnende Dezidualisierungsreaktion, da FOXO1 zusammen mit dem Transkriptionsfaktor C/EBP β (CCAAT/enhancer-binding-Protein β) den *dPRL*-Promotor aktiviert (Gellersen und Brosens, 2003) und eine erhöhte Expression von FOXO1 notwendig ist, damit die Prolaktinproduktion in den Zellen induziert werden kann. GJA1 spielt eine wichtige Rolle bei der interzellulären Kommunikation, da es in Form von Gap Junction-Kanälen die zytoplasmatischen Kompartimente zweier benachbarter Zellen miteinander verbindet. Es wird bereits sehr früh während der Dezidualisierung heraufreguliert, und es wurde gezeigt, dass humanes dezidualisiertes Gewebe ausgedehnte Gap Junctions besitzt (Tsuno et al., 2009; Yu et al., 2011). GJA1 sowie funktionelle Gap Junction-Kanäle werden für die morphologischen und biochemischen Veränderungen während der Differenzierung endometrialer Stromazellen benötigt (Laws et al., 2008; Yu et al., 2011). CD82, welches während der Dezidualisierung heraufreguliert wird, spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der endometrialen Stromazellen (Gellersen et al., 2007). Obwohl eine signifikante Induktion der Dezidualisierung des ektopen Endometriums anhand morphologischer Parameter sowie der Expression der spezifischen Dezidualisierungsmarker PRL und IGFBP1 nur nach kombinierter Behandlung mit Progesteron und hCG auftrat, zeigte sich in der vorliegenden Arbeit interessanterweise sowohl bei der kombinierten Behandlung mit Progesteron und Forskolin als auch hCG eine signifikante Steigerung der Transkription von *FOXO-1* und *GJA1* in dem ektopen endometrialen Gewebe im Vergleich zur Kontrolle. Es ist bekannt, dass das FOXO1-Protein *in vivo* im Nukleus dezidualisierter stromaler Zellen akkumuliert (Gellersen und Brosens, 2003). Dies war auch in der vorliegenden Studie gut im

immunhistochemischen Nachweis zu erkennen, wobei die FOXO1-Expression nach 7tägiger Behandlung mit Progesteron und hCG z.T. auch im Zytoplasma nachweisbar war. Dieser Anstieg der Expression von FOXO1 und GJA1 zeigte sich nach Behandlung mit Progesteron und Forskolin jedoch nur auf Transkript-, nicht aber auf Proteinebene, während für beide Behandlungen, Progesteron und Forskolin sowie Progesteron und hCG, tendenziell ein Anstieg der CD82-Proteinexpression zu beobachten war. Somit aktiviert offensichtlich auch die Behandlung mit Progesteron und Forskolin die Signalkaskade der Dezidualisierung in ektopem endometrialem Gewebe *in vivo*. Möglicherweise benötigt dieser Weg *in vivo* jedoch einen längeren Applikationszeitraum. Dass die Applikation von Progesteron in Kombination mit hCG zu einer deutlich stärkeren Dezidualisierungsreaktion führt als in Kombination mit Forskolin, könnte an den unterschiedlichen Signalwegen dieser beiden cAMP-Induktoren liegen. Die Spezifität und zeitliche Regulation des cAMP/PKA-Signalweges, der durch die Bindung von hCG an LH/hCG-Rezeptoren ausgelöst wird, wird durch die Generierung lokal begrenzter cAMP-Ansammlungen in der Zelle gewährleistet (Weedon-Fekjaer und Tasken, 2012). Phosphodiesterasen und die diskrete räumliche und zeitliche Aktivierung einer spezifischen Isoform der PKA sowie Proteinkinase A-Ankerproteine regulieren und organisieren diesen Prozess (Weedon-Fekjaer und Tasken, 2012). Forskolin stimuliert jedoch nichtselektiv fast alle Isoformen der Adenylatzyklase und greift auf diese Weise zentral in die Signaltransduktionswege vieler G-Protein-gekoppelter Rezeptoren ein. Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle durch Forskolin hat daher zahlreiche biologische Reaktionen zur Folge. Dies könnte den geringeren Effekt von Forskolin auf die Dezidualisierung erklären, da das durch Forskolin entstandene cAMP in der Zelle nicht ausschließlich mit dem Dezidualisierungssignalweg verknüpft ist.

Nach 10tägiger Behandlung der ektopen endometrialen Fragmente in NOD-SCID-Mäusen mit Progesteron und hCG zeigte sich auf Transkriptebe nach Untersuchung des frühen Dezidualisierungsmarkers *FOXO1* zwar ein Anstieg der Expression im Vergleich zur Kontrolle, jedoch ergaben sich keine Signifikanzen mehr. Dies könnte darin begründet sein, dass die Dezidualisierung zu diesem Zeitpunkt auch im Kontrollfragment beginnt. Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden vor Versuchsbeginn nicht ovariectomiert, so dass das endogene Progesteron nach 10 Tagen in den Kontrollfragmenten eine schwache Dezidualisierungsreaktion auslösen könnte. Auf Proteinebene zeigte sich jedoch nach 10tägiger Behandlung mit Progesteron und hCG eine stark signifikant erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors FOXO1 im Vergleich zur Kontrolle. In den

Kontrollfragmenten wurde demnach zunächst nur die *FOXO1*-mRNA, jedoch noch kein FOXO1-Protein synthetisiert und somit auch noch kein PRL. Auch für *GJA1*, einem noch früheren Marker als FOXO1, zeigte sich in den Kontrollen zu diesem Zeitpunkt ein zu den beiden Behandlungen gesteigertes *GJA1*-Transkriptlevel, jedoch keine erhöhte Proteinexpression.

Die induzierte Dezidualisierungsreaktion hatte im untersuchten Zeitraum von bis zu 10 Tagen keinen Effekt auf die Größe und das Gewicht der transplantierten Endometriumfragmente. Dies ist erklärbar, da es sich bei der Dezidualisierung zunächst um eine morphologische und biochemische Umbildung der endometrialen Stromazellen handelt (Tsuno et al., 2009).

Im Hinblick auf die Proliferation des ektopen endometrialen Gewebes zeigte das glanduläre Epithel der Kontrollfragmente eine durchschnittliche Proliferationsrate von ca. 30 % und bestätigt die Ergebnisse der Studie von Grümmer et al. (2001). Der durchschnittliche prozentuale Anteil Ki-67 positiver Zellen des Stromas betrug ca. 10 %. Somit proliferierten hauptsächlich die Drüsenepithelzellen in den ektopen humanen endometrialen Fragmenten. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der ektopen Läsionen mit Progesteron und hCG, die eine starke Dezidualisierungsreaktion induzierte, tendenziell zu einer Reduktion der Proliferationsrate der Drüsenepithelzellen führte. Obwohl Progesteron einen antiproliferativen Effekt auf das Endometrium hat (Moyer und Felix, 1998), konnte in der vorliegenden Arbeit nach alleiniger Progesteronbehandlung sowie nach Behandlung mit Progesteron und Forskolin keine Hemmung der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Dies könnte an dem in der Literatur beschriebenen verzögerten Effekt von Progesteron liegen (de Ziegler et al., 1998; Mizuno et al., 1998).

Es konnte hier somit gezeigt werden, dass durch eine Behandlung mit Progesteron in Kombination mit hCG erfolgreich eine Dezidualisierung des endometrialen Stromas in humanen ektopen endometrialen Läsionen induziert werden kann.

In der tierexperimentellen Forschung stellen Veränderungen des Uterusgewichtes generell einen gängigen Indikator für Östrogen- sowie Progesteronwirkung dar und werden daher stets zusätzlich analysiert. Im Hinblick auf das Gewicht des Uterus konnte in der vorliegenden Arbeit kein auffälliger Effekt im Mausorganismus festgestellt werden. Jedoch

weist die Maus eine andere Dezidualisierungskaskade auf als der Mensch. Somit kann hierdurch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die in den hier durchgeführten Experimenten verwendeten Dosierungen der unterschiedlichen Progestine und cAMP-steigernden Substanzen im eutopen Endometrium des Menschen zu signifikanten Veränderungen führen.

4.2 Vergleich des Effektes von Progesteron und MPA auf die Dezidualisierung

Zusätzlich zum Progesteron wurde in der vorliegenden Arbeit vergleichend der Effekt von MPA in Kombination mit hCG auf die Dezidualisierung ektopen endometrialen Gewebes untersucht. Das synthetische steroidale Progestin MPA wird schon lange zur medikamentösen Behandlung der Endometriose eingesetzt (Valle, 2002; Bruner-Tran et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die tägliche Einnahme von 30 mg MPA über einen Zeitraum von 90 Tagen in manchen Frauen zu einer deutlichen Atrophie des glandulären Epithels und zu einer dezidualen Reaktion des endometrialen Stromas führt (Moghissi und Boyce, 1976). Obwohl MPA mit einigem Erfolg zur Endometriose-Behandlung eingesetzt wird, werden durch die Einnahme unerwünschte Nebenwirkungen durch die Aktivierung von Zellsignalwegen nach Interaktion mit anderen nahe verwandten Steroidrezeptoren hervorgerufen (Moghissi und Boyce, 1976; Bruner-Tran et al., 2006). In Kombination mit hCG zeigte MPA den gleichen Effekt auf die Dezidualisierung des ektopen endometrialen Gewebes wie Progesteron. Es kam zu einer signifikanten Zunahme der dezidualisierten Stromabereiche in den ektopen Läsionen und parallel zu einer gesteigerten Expression von Dezidualisierungsmarkern. Im Gegensatz zu der Behandlung mit Progesteron und hCG zeigte sich jedoch nach Applikation von MPA und hCG eine deutlich höhere interindividuelle Varianz des Gewebes verschiedener Patientinnen in der Reaktion auf die Behandlung. Zum einen reagierte nach Behandlung mit MPA und hCG ein geringerer Prozentsatz der Gewebe mit einer Dezidualisierungsreaktion als nach Behandlung mit Progesteron und hCG, zum anderen fiel die Reaktion bei den Geweben, die auf die Behandlung ansprachen, aber stärker aus, so dass große Varianzen in den untersuchten Parametern resultierten. Interessanterweise zeigte sich in den ektopen endometrialen Läsionen, in denen eine starke Dezidualisierungsreaktion durch die Behandlung mit MPA und hCG ausgelöst wurde, eine starke Expression aktivierter

Caspase 3, einem Apoptosemarker, im dezidualisierten Stroma. Die Caspase 3 zählt zu den Effektorcysteinproteasen, die einerseits sekundäre Zielproteine wie DNAsen oder weitere Caspasen aktivieren, andererseits zelleigene Proteine wie Aktin und Lamin spalten und daher aktiv am Abbau des Zytoskeletts und der Kernstruktur beteiligt sind (Pop und Salvesen, 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass es möglich ist ektope endometriale Stromazellen *in vivo* terminal zu differenzieren und somit Apoptose in diesen Zellen auszulösen. Dies bietet einen interessanten Ansatz zur Entwicklung einer neuer therapeutischen Behandlung der Endometriose. Die Varianz zwischen den unterschiedlichen Patientinnen und deren Ursache soll in Folgeexperimenten mit größeren Fallzahlen untersucht werden.

4.3 Entzug von Dezidualisierungsinduktoren

Um zu überprüfen, ob ein Hormonabfall nach der Induktion der Dezidualisierung zu einer Regression der ektope endometriotischen Läsionen führt, wie es Healy und Hodgen (1983) für die Regression endometriotischer Läsion nach der Geburt postuliert hatten, wurde in einer weiteren Versuchsreihe der Effekt eines Entzugs der Dezidualisierungsinduktoren nach einer vorangegangenen 10tägigen Behandlung auf die Morphologie und Physiologie der ektope endometrialen Fragmente untersucht. Da die Applikation von Progesteron und hCG in den vorangegangenen Versuchen die verlässlichste Induktion einer Dezidualisierungsreaktion im Endometrium verschiedener Patientinnen aufwies, wurde dieser Versuchsansatz mit dieser hormonellen Behandlung durchgeführt, indem die transplantierten Mäuse zunächst für 10 Tage mit Progesteron und hCG behandelt wurden und die Kultur des ektope humanen Gewebes anschließend für weitere 7 Tage ohne Behandlung fortgesetzt wurde. Die Auswertung der ektope Fragmente am Ende dieser Versuchsreihe zeige in der histomorphologische Analyse eine größere Fläche dezidualisierten Gewebes im Vergleich zur Kontrolle, die jedoch nun nicht mehr - wie unmittelbar nach der 10tägigen Behandlung mit Progesteron und hCG - signifikant war. Es zeigte sich jedoch weiterhin ein signifikant gesteigertes *dPRL*-Transkriptlevel als Marker für die physiologische Funktion der dezidualisierten Zellen. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den ektope Fragmenten für die Transkriptmenge der frühen Dezidualisierungsmarker *FOXO-1* und *GJA1* eine Abnahme nach Entzug der Dezidualisierungsinduktoren im Vergleich zu den 10tägig behandelten Fragmenten.

Parallel ergab die Untersuchung auf Proteinebene zwar immer noch einen deutlichen Anstieg der FOXO-1-Expression im Vergleich zur Kontrolle, jedoch war dieser nicht mehr signifikant, wie dies zuvor bei 10tägiger Behandlung beobachtet wurde. Auch war die Expression von FOXO-1 nun wieder fast ausschließlich im Zytoplasma der ektopen endometrialen Stromazellen lokalisiert. Diese Befunde weisen darauf hin, die Behandlungsdauer zur terminalen Differenzierung des ektopen endometrialen Gewebes möglicherweise nicht ausgereicht hat. Es wurde zuvor in *in vitro*-Studien gezeigt, dass eine dauerhafte Gabe von Progesteron und cAMP notwendig ist um den dezidualen Phänotyp endometrialer Stromazellen aufrechtzuerhalten (Tanaka et al., 1993; Telgmann und Gellersen, 1998) und dass diese nach Entzug des cAMP-Stimulus *in vitro* ihren undifferenzierten Phänotyp wiedererhalten und die Expression der Differenzierungsmarker dPRL und IGFBP-1 einstellen (Gellersen und Brosens, 2003). Andererseits konnte 7 Tage nach Entzug der Dezidualisierungsinduktoren eine tendenzielle Größenabnahme der ektopen Fragmente und eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate in den endometrialen Stromazellen der ektopen Fragmente gezeigt werden. Somit könnte dieser Proliferationsstopp und als Folge eine Reduktion der Größe der ektopen Läsionen möglicherweise durch eine längere vorausgehende Phase der Behandlung verstärkt werden. In weiterführenden Experimenten soll geklärt werden, ob eher durch eine dauerhafte Behandlung mit Progestinen und hCG oder zusätzlich durch einen nachfolgenden Entzug der Dezidualisierungsinduktoren ein therapeutischer Effekt auf die Persistenz der ektopen endometrialen Läsionen erreicht werden kann.

4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es möglich ist durch die Behandlung mit Progestinen in Kombination mit hCG die Dezidualisierung ektoper humaner endometrialer Läsionen *in vivo* zu induzieren, somit einen Proliferationsstopp hervorzurufen und letztendlich in diesen terminal differenzierten Stromazellen Apoptose auszulösen. Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass die Dezidualisierung endometrialen Gewebes einen hemmenden Einfluss auf die Persistenz endometriotischer Läsionen haben kann und dass eine Progestintherapie sowie die hohe Serumprogesteronkonzentration während der Schwangerschaft in manchen Frauen einen therapeutischen Einfluss auf die Erkrankung besitzt, da durch die Dezidualisierung der endometrialen Stromazellen

letztendlich eine Atrophie des ektopen Gewebes induziert wird (Novak und Hoge, 1958; Andrews et al., 1959; Olive und Haney, 1986; Metzger und Haney, 1988; Mahmood und Templeton, 1990; Tabanelli et al., 1992; Bruner-Tran et al., 2002; 2006). Moen und Muus (1991) konnten jedoch in 23% der schwangeren Frauen keine Dezidualisierung der endometriotischen Läsionen als Reaktion auf die Schwangerschaft finden. Dies steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass endometriotische Läsionen in manchen Fällen weder auf normale zyklische Variationen noch auf eine exogene hormonale Therapie reagieren (Bergqvist et al., 1984; Brosens et al., 1987; Metzger et al., 1988; Moen und Muus, 1991). Klemmt et al. (2006) konnten zeigen, dass endometriotische Läsionen und eutopes Endometrium einiger erkrankter Frauen über eine reduzierte Kapazität zur Dezidualisierung verfügen. Eine nichtadäquate Differenzierung des eutopen Endometriums bei Endometriose-Patientinnen könnte ein Grund für das Auftreten der Erkrankung sowie für die hohe Rezidivrate sein, da diese reduzierte Differenzierungskapazität der endometrialen Stromazellen mit einer erhöhten Überlebens- und Proliferationsfähigkeit der stromalen Zellen in der ektopen Umgebung assoziiert sein könnte. Dieses reduzierte Potential zur Dezidualisierung ist vermutlich durch die nachgewiesene Progesteronresistenz des Endometriums von an Endometriose erkrankten Frauen begründet (Attia et al., 2000; Bruner-Tran et al., 2006). Die Menge der Progesteronrezeptoren in endometriotischem Gewebe ist variabel und stellt daher eine Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedliche Effektivität von Progesteron als therapeutischen Wirkstoff in erkrankten Frauen dar (Bergqvist et al., 1981; Janne et al., 1981; Bruner-Tran et al., 2006). Somit ist die alleinige Therapie mit Progesteron nicht immer erfolgreich. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die gleichzeitige Verabreichung von Progesteron und hCG die Dezidualisierungsreaktion der endometrialen Stromazellen deutlich verstärkt werden kann.

Hierin könnte ein neuartiger Therapieansatz für die zukünftige Endometriose-Behandlung liegen, den es gilt, in weiterführenden Analysen zu optimieren. Hierzu müssen die optimalen Dosen für das Progestin und hCG ausgetestet werden. Durch die starke Wirkung von hCG könnte möglicherweise eine erfolgreiche Therapie auch in erkrankten Frauen mit endometrialer Progesteronresistenz durchgeführt werden. Zudem bleibt zu analysieren, inwieweit dieser Effekt durch die Verwendung von Progestinen, die nicht ausschließlich an den Progesteronrezeptor binden (wie MPA) verstärkt werden kann. Neben dem Effekt auf die ektopen endometrialen Läsionen könnte eine solche Behandlung zudem eine adäquate Dezidualisierung des eutopen Endometriums auslösen. Hierdurch

könnte das Invasions- und Wachstumspotential der durch die retrograde Menstruation in die Peritonealhöhle gelangten Zellen und damit die Neuentstehung von endometriotischen Läsionen reduziert oder verhindert werden. So konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Verabreichung von Progestinen nicht nur die Dezidualisierung endometriotischer Läsionen, sondern auch die Dezidualisierung des eutopen Endometriums induziert (Cornillie et al., 1987; Deligdisch, 2000; Phillips et al., 2003), so dass eine Kombination von Progestinen und hCG vermutlich auch die Dezidualisierung des eutopen Endometriums verstärken würde. Eine Behandlung mit hCG stellt zudem eine natürliche und spezifische Möglichkeit dar, auf das ektope Fragment zu wirken ohne andere Organe außerhalb des Reproduktionssystems zu beeinflussen. Somit könnte die Behandlung mit hCG in Kombination mit Progestinen eine Möglichkeit zur Entwicklung neuer Therapieansätze in der Endometriosebehandlung darstellen.

5 Zusammenfassung

Trotz jahrzehntelanger Forschung ist die Pathogenese der Endometriose heutzutage immer noch nicht ausreichend verstanden und die vorhandenen Therapiemöglichkeiten sind begrenzt. Die aktuelle medikamentöse Behandlung der Endometriose basiert auf der hormonellen Unterdrückung des Menstruationszyklus. Da diese Therapie mit unerwünschten Nebenwirkungen und hohen Rezidivraten verbunden ist, besteht eine Notwendigkeit spezifischere therapeutische Strategien zu entwickeln. In der Literatur wurde beschrieben, dass die Schwere der Erkrankung entscheidend dadurch beeinflusst wird, ob die endometrialen Zellen an den ektopen Stellen proliferieren oder differenzieren. Ziel dieser Arbeit war es daher mit Hilfe des humanisierten Endometriose-Mausmodells die Wirkung von Progestinen kombiniert mit zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-steigernden Substanzen auf die Induktion der terminalen Differenzierung (Dezidualisierung) humanen ektopen endometrialen Gewebes *in vivo* zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Dezidualisierung ektopen endometrialen Gewebes signifikant durch die Applikation von Progesteron und humanem Choriongonadotropin (hCG) induziert werden kann, während die Behandlung mit Progesteron alleine keinen und die Kombination von Progesteron und Forskolin einen deutlich schwächeren Effekt zeigte. Durch Induktion der terminalen Differenzierung der ektopen endometrialen Stromazellen konnte die Proliferationsrate im Vergleich zum Kontrollgewebe reduziert werden. In Kombination mit hCG zeigte Medroxyprogesteronacetat (MPA) den gleichen Effekt auf die Dezidualisierung des ektopen endometrialen Gewebes wie Progesteron. Im Gegensatz zu der Behandlung mit Progesteron und hCG zeigte sich jedoch nach Applikation von MPA und hCG eine deutlich höhere interindividuelle Varianz des Gewebes verschiedener Patientinnen in der Reaktion auf die Behandlung. Interessanterweise zeigte sich in den ektopen endometrialen Läsionen, in denen eine starke Dezidualisierungsreaktion durch die Behandlung mit MPA und hCG ausgelöst wurde, eine starke Expression aktivierter Caspase 3, einem Marker für apoptotische Zellen, im dezidualisierten Stroma. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen erstmalig, dass es möglich ist ektope endometriale Stromazellen *in vivo* terminal zu differenzieren und somit Apoptose in diesen Zellen auszulösen. Auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie können weiterführende Analysen aufbauen, um neuartige Behandlungsstrategien für die Endometriose zu entwickeln.

6 Literaturverzeichnis

- 1 American Society for Reproductive Medicine (1997): Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 67, 817-21.
- 2 Andrews, M. C., Andrews, W. C. and Strauss, A. F. (1959): Effects of progestin-induced pseudopregnancy on endometriosis: clinical and microscopic studies. *Am J Obstet Gynecol* 78, 776-85.
- 3 Aoki, D., Katsuki, Y., Shimizu, A., Kakinuma, C. and Nozawa, S. (1994): Successful heterotransplantation of human endometrium in SCID mice. *Obstet Gynecol* 83, 220-8.
- 4 Arumugam, K. and Lim, J. M. (1997): Menstrual characteristics associated with endometriosis. *Br J Obstet Gynaecol* 104, 948-50.
- 5 Attia, G. R., Zeitoun, K., Edwards, D., Johns, A., Carr, B. R. and Bulun, S. E. (2000): Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2897-902.
- 6 Badawy, S. Z., Cuenca, V., Marshall, L., Munchback, R., Rinas, A. C. and Coble, D. A. (1984): Cellular components in peritoneal fluid in infertile patients with and without endometriosis. *Fertil Steril* 42, 704-8.
- 7 Bergqvist, A., Jeppsson, S., Kullander, S. and Ljungberg, O. (1985a): Human endometrium transplanted into nude mice. Histologic effects of various steroid hormones. *Am J Pathol* 119, 336-44.
- 8 Bergqvist, A., Jeppsson, S. and Ljungberg, O. (1985b): Histochemical demonstration of estrogen and progesterone binding in endometriotic tissue and in uterine endometrium: A comparative study. *J Histochem Cytochem* 33, 155-61.
- 9 Bergqvist, A., Ljungberg, O. and Myhre, E. (1984): Human endometrium and endometriotic tissue obtained simultaneously: a comparative histological study. *Int J Gynecol Pathol* 3, 135-45.
- 10 Bergqvist, A., Rannevik, G. and Thorell, J. (1981): Estrogen and progesterone cytosol receptor concentration in endometriotic tissue and intrauterine endometrium. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 101, 53-8.
- 11 Blumenkrantz, M. J., Gallagher, N., Bashore, R. A. and Tenckhoff, H. (1981): Retrograde menstruation in women undergoing chronic peritoneal dialysis. *Obstet Gynecol* 57, 667-70.
- 12 Brosens, I. A. (1997): Endometriosis--a disease because it is characterized by bleeding. *Am J Obstet Gynecol* 176, 263-7.
- 13 Brosens, I. A., Verleyen, A. and Cornillie, F. (1987): The morphologic effect of short-term medical therapy of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 157, 1215-21.

- 14 Bruner-Tran, K. L., Eisenberg, E., Yeaman, G. R., Anderson, T. A., McBean, J. and Osteen, K. G. (2002): Steroid and cytokine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis and the establishment of experimental endometriosis in nude mice. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 4782-91.
- 15 Bruner-Tran, K. L., Zhang, Z., Eisenberg, E., Winneker, R. C. and Osteen, K. G. (2006): Down-regulation of endometrial matrix metalloproteinase-3 and -7 expression in vitro and therapeutic regression of experimental endometriosis in vivo by a novel nonsteroidal progesterone receptor agonist, tanaproget. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 1554-60.
- 16 Bruner, K. L., Matrisian, L. M., Rodgers, W. H., Gorstein, F. and Osteen, K. G. (1997): Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice. *J Clin Invest* 99, 2851-7.
- 17 Candiani, G. B., Vercellini, P., Fedele, L., Bocciolone, L. and Bianchi, C. (1990): Medical treatment of mild endometriosis in infertile women: analysis of a failure. *Hum Reprod* 5, 901-5.
- 18 Chishima, F., Hayakawa, S., Sugita, K., Kinukawa, N., Aleemuzzaman, S., Nemoto, N., Yamamoto, T. and Honda, M. (2002): Increased expression of cyclooxygenase-2 in local lesions of endometriosis patients. *Am J Reprod Immunol* 48, 50-6.
- 19 Cornillie, F. J., Puttemans, P. and Brosens, I. A. (1987): Histology and ultrastructure of human endometriotic tissues treated with dydrogesterone (Duphaston). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 26, 39-55.
- 20 Cramer, D. W., Wilson, E., Stillman, R. J., Berger, M. J., Belisle, S., Schiff, I., Albrecht, B., Gibson, M., Stadel, B. V. and Schoenbaum, S. C. (1986): The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise. *Jama* 255, 1904-8.
- 21 Cummings, A. M. and Metcalf, J. L. (1995): Induction of endometriosis in mice: a new model sensitive to estrogen. *Reprod Toxicol* 9, 233-8.
- 22 Cunha, G. R., Bigsby, R. M., Cooke, P. S. and Sugimura, Y. (1985): Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell Differ* 17, 137-48.
- 23 Cunha, G. R., Chung, L. W., Shannon, J. M. and Reese, B. A. (1980): Stromal-epithelial interactions in sex differentiation. *Biol Reprod* 22, 19-42.
- 24 D'Hooghe, T. M. and Debrock, S. (2002): Endometriosis, retrograde menstruation and peritoneal inflammation in women and in baboons. *Hum Reprod Update* 8, 84-8.
- 25 D'Hooghe, T. M., Debrock, S., Meuleman, C., Hill, J. A. and Mwenda, J. M. (2003): Future directions in endometriosis research. *Obstet Gynecol Clin North Am* 30, 221-44.
- 26 D'Hooghe, T. M., Kyama, C., Debrock, S., Meuleman, C. and Mwenda, J. M. (2004): Future directions in endometriosis research. *Ann N Y Acad Sci* 1034, 316-25.

- 27 de Ziegler, D., Fanchin, R., de Moustier, B. and Bulletti, C. (1998): The hormonal control of endometrial receptivity: estrogen (E2) and progesterone. *J Reprod Immunol* 39, 149-66.
- 28 Deligdisch, L. (2000): Hormonal pathology of the endometrium. *Mod Pathol* 13, 285-94.
- 29 Dimitriadis, E., Robb, L. and Salamonsen, L. A. (2002): Interleukin 11 advances progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 8, 636-43.
- 30 Dizerega, G. S., Barber, D. L. and Hodgen, G. D. (1980): Endometriosis: role of ovarian steroids in initiation, maintenance, and suppression. *Fertil Steril* 33, 649-53.
- 31 Dmowski, W. P., Gebel, H. M. and Rawlins, R. G. (1989): Immunologic aspects of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 16, 93-103.
- 32 Donnez, J., Nisolle, M. and Casanas-Roux, F. (1994): Peritoneal endometriosis: two-dimensional and three-dimensional evaluation of typical and subtle lesions. *Ann N Y Acad Sci* 734, 342-51.
- 33 Donnez, J., Nisolle, M., Casanas-Roux, F., Bassil, S. and Anaf, V. (1995): Rectovaginal septum, endometriosis or adenomyosis: laparoscopic management in a series of 231 patients. *Hum Reprod* 10, 630-5.
- 34 Donnez, J., Nisolle, M., Casanas-Roux, F., Brion, P. and Da Costa Ferreira, N. (1996): Stereometric evaluation of peritoneal endometriosis and endometriotic nodules of the rectovaginal septum. *Hum Reprod* 11, 224-8.
- 35 Drake, T. S., O'Brien, W. F. and Ramwell, P. W. (1983): Peritoneal fluid prostanoids in unexplained infertility. *Am J Obstet Gynecol* 147, 63-4.
- 36 Dunselman, G. A., Groothuis, P. G., de Goeij, A. F. and Evers, J. L. (2001): The Mesothelium, Teflon or Velcro? Mesothelium in endometriosis pathogenesis. *Hum Reprod* 16, 605-7.
- 37 Dunselman, G. A., Willebrand, D., Land, J. A., Bouckaert, P. X. and Evers, J. L. (1989): A rabbit model of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 27, 29-33.
- 38 Eisermann, J., Gast, M. J., Pineda, J., Odem, R. R. and Collins, J. L. (1988): Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery. *Fertil Steril* 50, 573-9.
- 39 Eskenazi, B. and Warner, M. L. (1997): Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 24, 235-58.
- 40 Fazleabas, A. T., Brudney, A., Gurates, B., Chai, D. and Bulun, S. (2002): A modified baboon model for endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 955, 308-17; discussion 340-2, 396-406.

- 41 Fechner, S., Husen, B., Thole, H., Schmidt, M., Gashaw, I., Kimmig, R., Winterhager, E. and Grummer, R. (2007): Expression and regulation of estrogen-converting enzymes in ectopic human endometrial tissue. *Fertil Steril* 88, 1029-38.
- 42 Frank, G. R., Brar, A. K., Cedars, M. I. and Handwerger, S. (1994): Prostaglandin E2 enhances human endometrial stromal cell differentiation. *Endocrinology* 134, 258-63.
- 43 Galle, P. C. (1989): Clinical presentation and diagnosis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 16, 29-42.
- 44 Gao, X., Outley, J., Botteman, M., Spalding, J., Simon, J. A. and Pashos, C. L. (2006): Economic burden of endometriosis. *Fertil Steril* 86, 1561-72.
- 45 Gardner, G. H., Greene, R. R. and Ranney, B. (1953): The histogenesis of endometriosis; recent contributions. *Obstet Gynecol* 1, 615-37.
- 46 Gellersen, B., Briese, J., Oberndorfer, M., Redlin, K., Samalecos, A., Richter, D. U., Loning, T., Schulte, H. M. and Bamberger, A. M. (2007): Expression of the metastasis suppressor KAI1 in decidual cells at the human maternal-fetal interface: Regulation and functional implications. *Am J Pathol* 170, 126-39.
- 47 Gellersen, B. and Brosens, J. (2003): Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol* 178, 357-72.
- 48 Giudice, L. C. and Kao, L. C. (2004): Endometriosis. *Lancet* 364, 1789-99.
- 49 Grummer, R. (2006): Animal models in endometriosis research. *Hum Reprod Update* 12, 641-9.
- 50 Grummer, R., Schwarzer, F., Balczyk, K., Hess-Stumpp, H., Regidor, P. A., Schindler, A. E. and Winterhager, E. (2001): Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model. *Hum Reprod* 16, 1736-43.
- 51 Halme, J., Becker, S., Hammond, M. G. and Raj, S. (1982): Pelvic macrophages in normal and infertile women: the role of patent tubes. *Am J Obstet Gynecol* 142, 890-5.
- 52 Halme, J., Hammond, M. G., Hulka, J. F., Raj, S. G. and Talbert, L. M. (1984): Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 64, 151-4.
- 53 Han, S. W., Lei, Z. M. and Rao, C. V. (1997): Homologous down-regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors by increasing the degradation of receptor transcripts in human uterine endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 57, 158-64.
- 54 Healy, D. L. and Hodgen, G. D. (1983): The endocrinology of human endometrium. *Obstet Gynecol Surv* 38, 509-30.
- 55 Huang, J. R., Tseng, L., Bischof, P. and Janne, O. A. (1987): Regulation of prolactin production by progestin, estrogen, and relaxin in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 121, 2011-7.

- 56 Janne, O., Kauppila, A., Kokko, E., Lantto, T., Ronnberg, L. and Vihko, R. (1981): Estrogen and progestin receptors in endometriosis lesions: comparison with endometrial tissue. *Am J Obstet Gynecol* 141, 562-6.
- 57 Javert, C. T. (1949): Pathogenesis of endometriosis based on endometrial homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogenous metastasis, including five case reports of endometrial tissue in pelvic lymph nodes. *Cancer* 2, 399-410.
- 58 Jones, R. L., Findlay, J. K. and Salamonsen, L. A. (2006): The role of activins during decidualisation of human endometrium. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 46, 245-9.
- 59 Kajihara, T., Tochigi, H., Uchino, S., Itakura, A., Brosens, J. J. and Ishihara, O. (2011): Differential effects of urinary and recombinant chorionic gonadotropin on oxidative stress responses in decidualizing human endometrial stromal cells. *Placenta* 32, 592-7.
- 60 Kao, L. C., Germeyer, A., Tulac, S., Lobo, S., Yang, J. P., Taylor, R. N., Osteen, K., Lessey, B. A. and Giudice, L. C. (2003): Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 144, 2870-81.
- 61 Kasahara, K., Takakura, K., Takebayashi, K., Kimura, F., Nakanishi, K. and Noda, Y. (2001): The role of human chorionic gonadotropin on decidualization of endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1281-6.
- 62 Kauma, S., Clark, M. R., White, C. and Halme, J. (1988): Production of fibronectin by peritoneal macrophages and concentration of fibronectin in peritoneal fluid from patients with or without endometriosis. *Obstet Gynecol* 72, 13-8.
- 63 Kennedy, S., Bergqvist, A., Chapron, C., D'Hooghe, T., Dunselman, G., Greb, R., Hummelshoj, L., Prentice, A. and Saridogan, E. (2005): ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 20, 2698-704.
- 64 Kim, J. J., Jaffe, R. C. and Fazleabas, A. T. (1998): Comparative studies on the in vitro decidualization process in the baboon (*Papio anubis*) and human. *Biol Reprod* 59, 160-8.
- 65 Kistner, R. W. (1958): The use of newer progestins in the treatment of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 75, 264-78.
- 66 Koninckx, P. R., Ide, P., Vandenbroucke, W. and Brosens, I. A. (1980): New aspects of the pathophysiology of endometriosis and associated infertility. *J Reprod Med* 24, 257-60.
- 67 Lamb, K., Hoffmann, R. G. and Nichols, T. R. (1986): Family trait analysis: a case-control study of 43 women with endometriosis and their best friends. *Am J Obstet Gynecol* 154, 596-601.

- 68 Laws, M. J., Taylor, R. N., Sidell, N., DeMayo, F. J., Lydon, J. P., Gutstein, D. E., Bagchi, M. K. and Bagchi, I. C. (2008): Gap junction communication between uterine stromal cells plays a critical role in pregnancy-associated neovascularization and embryo survival. *Development* 135, 2659-68.
- 69 Ledger, W. L. (1999): Endometriosis and infertility: an integrated approach. *Int J Gynaecol Obstet* 64 Suppl 1, S33-40.
- 70 Lynch, V. J., Brayer, K., Gellersen, B. and Wagner, G. P. (2009): HoxA-11 and FOXO1A cooperate to regulate decidual prolactin expression: towards inferring the core transcriptional regulators of decidual genes. *PLoS One* 4, e6845.
- 71 Mahmood, T. A. and Templeton, A. (1990): Pathophysiology of mild endometriosis: review of literature. *Hum Reprod* 5, 765-84.
- 72 Malinak, L. R., Buttram, V. C., Jr., Elias, S. and Simpson, J. L. (1980): Heritage aspects of endometriosis. II. Clinical characteristics of familial endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 137, 332-7.
- 73 Maruyama, T. and Yoshimura, Y. (2008): Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. *Endocr J* 55, 795-810.
- 74 McArthur, J. W. and Ulfelder, H. (1965): The effect of pregnancy upon endometriosis. *Obstet Gynecol Surv* 20, 709-33.
- 75 Merrill, J. A. (1966): Endometrial induction of endometriosis across Millipore filters. *Am J Obstet Gynecol* 94, 780-90.
- 76 Metzger, D. A. and Haney, A. F. (1988): Endometriosis: etiology and pathophysiology of infertility. *Clin Obstet Gynecol* 31, 801-12.
- 77 Metzger, D. A., Olive, D. L. and Haney, A. F. (1988): Limited hormonal responsiveness of ectopic endometrium: histologic correlation with intrauterine endometrium. *Hum Pathol* 19, 1417-24.
- 78 Mizuno, K., Tanaka, T., Umesaki, N. and Ogita, S. (1998): Establishment and characterization of in vitro decidualization in normal human endometrial stromal cells. *Osaka City Med J* 44, 105-15.
- 79 Moen, M. H. and Muus, K. M. (1991): Endometriosis in pregnant and non-pregnant women at tubal sterilization. *Hum Reprod* 6, 699-702.
- 80 Moghissi, K. S. and Boyce, C. R. (1976): Management of endometriosis with oral medroxyprogesterone acetate. *Obstet Gynecol* 47, 265-7.
- 81 Monckedieck, V., Sannecke, C., Husen, B., Kumbartski, M., Kimmig, R., Totsch, M., Winterhager, E. and Grummer, R. (2009): Progestins inhibit expression of MMPs and of angiogenic factors in human ectopic endometrial lesions in a mouse model. *Mol Hum Reprod* 15, 633-43.
- 82 Moyer, D. L. and Felix, J. C. (1998): The effects of progesterone and progestins on endometrial proliferation. *Contraception* 57, 399-403.

- 83 Muscato, J. J., Haney, A. F. and Weinberg, J. B. (1982): Sperm phagocytosis by human peritoneal macrophages: a possible cause of infertility in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 144, 503-10.
- 84 Nisolle-Pochet, M., Casanas-Roux, F. and Donnez, J. (1988): Histologic study of ovarian endometriosis after hormonal therapy. *Fertil Steril* 49, 423-6.
- 85 Nisolle, M., Casanas-Roux, F., Anaf, V., Mine, J. M. and Donnez, J. (1993): Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 59, 681-4.
- 86 Nisolle, M., Casanas-Roux, F. and Donnez, J. (2000a): Early-stage endometriosis: adhesion and growth of human menstrual endometrium in nude mice. *Fertil Steril* 74, 306-12.
- 87 Nisolle, M., Casanas-Roux, F., Marbaix, E., Jadoul, P. and Donnez, J. (2000b): Transplantation of cultured explants of human endometrium into nude mice. *Hum Reprod* 15, 572-7.
- 88 Noci, I., Borri, P., Chieffi, O., Scarselli, G., Biagiotti, R., Moncini, D., Paglierani, M. and Taddei, G. (1995): I. Aging of the human endometrium: a basic morphological and immunohistochemical study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 63, 181-5.
- 89 Novak, E. R. and Hoge, A. F. (1958): Endometriosis of the lower genital tract. *Obstet Gynecol* 12, 687-93.
- 90 Olive, D. L. and Haney, A. F. (1986): Endometriosis--associated infertility: a critical review of therapeutic approaches. *Obstet Gynecol Surv* 41, 538-55.
- 91 Olive, D. L. and Henderson, D. Y. (1987): Endometriosis and mullerian anomalies. *Obstet Gynecol* 69, 412-5.
- 92 Oosterlynck, D. J., Cornillie, F. J., Waer, M., Vandeputte, M. and Koninckx, P. R. (1991): Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 56, 45-51.
- 93 Osteen, K. G., Rodgers, W. H., Gaire, M., Hargrove, J. T., Gorstein, F. and Matrisian, L. M. (1994): Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in human endometrium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10129-33.
- 94 Phillips, V., Graham, C. T., Manek, S. and McCluggage, W. G. (2003): The effects of the levonorgestrel intrauterine system (Mirena coil) on endometrial morphology. *J Clin Pathol* 56, 305-7.
- 95 Pinkert, T. C., Catlow, C. E. and Straus, R. (1979): Endometriosis of the urinary bladder in a man with prostatic carcinoma. *Cancer* 43, 1562-7.
- 96 Pop, C. and Salvesen, G. S. (2009): Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* 284, 21777-81.

- 97 Prast, J., Saleh, L., Husslein, H., Sonderegger, S., Helmer, H. and Knofler, M. (2008): Human chorionic gonadotropin stimulates trophoblast invasion through extracellularly regulated kinase and AKT signaling. *Endocrinology* 149, 979-87.
- 98 Punnonen, R., Klemi, P. J. and Nikkanen, V. (1980): Postmenopausal endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 11, 195-200.
- 99 Ramathal, C. Y., Bagchi, I. C., Taylor, R. N. and Bagchi, M. K. (2010): Endometrial decidualization: of mice and men. *Semin Reprod Med* 28, 17-26.
- 100 Reshef, E., Lei, Z. M., Rao, C. V., Pridham, D. D., Chegini, N. and Luborsky, J. L. (1990): The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 70, 421-30.
- 101 Rock, J. A. and Markham, S. M. (1992): Pathogenesis of endometriosis. *Lancet* 340, 1264-7.
- 102 Rosenberg, S. M. and Bhatnagar, A. S. (1984): Sex steroid and human chorionic gonadotropin modulation of in vitro prolactin production by human term decidua. *Am J Obstet Gynecol* 148, 461-5.
- 103 Rossi, G., Somigliana, E., Moschetta, M., Santorsola, R., Cozzolino, S., Filardo, P., Salmaso, A. and Zingrillo, B. (2000): Dynamic aspects of endometriosis in a mouse model through analysis of implantation and progression. *Arch Gynecol Obstet* 263, 102-7.
- 104 Saleh, L., Prast, J., Haslinger, P., Husslein, P., Helmer, H. and Knofler, M. (2007): Effects of different human chorionic gonadotrophin preparations on trophoblast differentiation. *Placenta* 28, 199-203.
- 105 Sampson, J. A. (1927): Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am J Pathol* 3, 93-110 43.
- 106 Schenken, R. S., Williams, R. F. and Hodgen, G. D. (1987): Effect of pregnancy on surgically induced endometriosis in cynomolgus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 157, 1392-6.
- 107 Schrodtt, G. R., Alcorn, M. O. and Ibanez, J. (1980): Endometriosis of the male urinary system: a case report. *J Urol* 124, 722-3.
- 108 Scott, R. B. and Te Linde, R. W. (1954): Clinical external endometriosis; probable viability of menstrually shed fragments of endometrium. *Obstet Gynecol* 4, 502-10.
- 109 Simoens, S., Hummelshoj, L. and D'Hooghe, T. (2007): Endometriosis: cost estimates and methodological perspective. *Hum Reprod Update* 13, 395-404.
- 110 Steinleitner, A., Lambert, H., Suarez, M., Serpa, N., Robin, B. and Cantor, B. (1991): Periovulatory calcium channel blockade enhances reproductive performance in an animal model for endometriosis-associated subfertility. *Am J Obstet Gynecol* 164, 949-52.

-
- 111 Story, L. and Kennedy, S. (2004): Animal studies in endometriosis: a review. *Ilar J* 45, 132-8.
- 112 Sugino, N., Karube-Harada, A., Sakata, A., Takiguchi, S. and Kato, H. (2002): Different mechanisms for the induction of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase by progesterone in human endometrial stromal cells. *Hum Reprod* 17, 1709-14.
- 113 Tabanelli, S., Tang, B. and Gurside, E. (1992): In vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42, 337-44.
- 114 Tanaka, N., Miyazaki, K., Tashiro, H., Mizutani, H. and Okamura, H. (1993): Changes in adenylyl cyclase activity in human endometrium during the menstrual cycle and in human decidua during pregnancy. *J Reprod Fertil* 98, 33-9.
- 115 Tang, B. and Gurside, E. (1993): Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stroma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 47, 115-21.
- 116 Telgmann, R. and Gellersen, B. (1998): Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene. *Hum Reprod Update* 4, 472-9.
- 117 Tsampalas, M., Grident, V., Berndt, S., Foidart, J. M., Geenen, V. and Perrier d'Hauterive, S. (2010): Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J Reprod Immunol* 85, 93-8.
- 118 Tseng, L., Gao, J. G., Chen, R., Zhu, H. H., Mazella, J. and Powell, D. R. (1992): Effect of progestin, antiprogestin, and relaxin on the accumulation of prolactin and insulin-like growth factor-binding protein-1 messenger ribonucleic acid in human endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 47, 441-50.
- 119 Tsuno, A., Nasu, K., Yuge, A., Matsumoto, H., Nishida, M. and Narahara, H. (2009): Decidualization attenuates the contractility of eutopic and ectopic endometrial stromal cells: implications for hormone therapy of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 2516-23.
- 120 Valle, R. F. (2002): Endometriosis: current concepts and therapy. *Int J Gynaecol Obstet* 78, 107-19.
- 121 Vercellini, P., De Giorgi, O., Aimi, G., Panazza, S., Uglietti, A. and Crosignani, P. G. (1997): Menstrual characteristics in women with and without endometriosis. *Obstet Gynecol* 90, 264-8.
- 122 Vernon, M. W., Beard, J. S., Graves, K. and Wilson, E. A. (1986): Classification of endometriotic implants by morphologic appearance and capacity to synthesize prostaglandin F. *Fertil Steril* 46, 801-6.
- 123 Vernon, M. W. and Wilson, E. A. (1985): Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertil Steril* 44, 684-94.
- 124 Vigano, P., Vercellini, P., Di Blasio, A. M., Colombo, A., Candiani, G. B. and Vignali, M. (1991): Deficient antiendometrium lymphocyte-mediated cytotoxicity in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 56, 894-9.

-
- 125 Weedon-Fekjaer, M. S. and Tasken, K. (2012): Review: Spatiotemporal dynamics of hCG/cAMP signaling and regulation of placental function. *Placenta* 33 Suppl, S87-91.
- 126 Wortis, H. H. (1971): Immunological responses of 'nude' mice. *Clin Exp Immunol* 8, 305-17.
- 127 Yarram, S. J., Jenkins, J., Cole, L. A., Brown, N. L., Sandy, J. R. and Mansell, J. P. (2004): Epidermal growth factor contamination and concentrations of intact human chorionic gonadotropin in commercial preparations. *Fertil Steril* 82, 232-3.
- 128 Yu, J., Wu, J., Bagchi, I. C., Bagchi, M. K., Sidell, N. and Taylor, R. N. (2011): Disruption of gap junctions reduces biomarkers of decidualization and angiogenesis and increases inflammatory mediators in human endometrial stromal cell cultures. *Mol Cell Endocrinol* 344, 25-34.
- 129 Zamah, N. M., Dodson, M. G., Stephens, L. C., Buttram, V. C., Jr., Besch, P. K. and Kaufman, R. H. (1984): Transplantation of normal and ectopic human endometrial tissue into athymic nude mice. *Am J Obstet Gynecol* 149, 591-7.
- 130 Zhang, R. J., Wild, R. A. and Ojago, J. M. (1993): Effect of tumor necrosis factor-alpha on adhesion of human endometrial stromal cells to peritoneal mesothelial cells: an in vitro system. *Fertil Steril* 59, 1196-201.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Nachweis der Speziespezifität der verwendeten Oligonukleotide	37
Abb. 2: Uterusgewichte der NOD-SCID Mäuse nach 7tägiger Behandlung	39
Abb. 3: Wachstumsverhalten der ektopen Läsionen	39
Abb. 4: Histomorphologische Analyse der ektopen Läsionen	41
Abb. 5: Expression von <i>dPRL</i> und <i>IGFBP1</i>	42
Abb. 6: Immunhistochemischer Nachweis der dPRL-Expression	43
Abb. 7: Expression von <i>FOXO1</i> und <i>GJA1</i>	44
Abb. 8: Immunhistochemischer Nachweis der FOXO1-Expression.....	45
Abb. 9: Immunhistochemischer Nachweis der GJA1-Expression	46
Abb. 10: Expressionsanalyse von GJA1.....	47
Abb. 11: Expressionsanalyse von CD82	47
Abb. 12: Immunhistochemischer Nachweis der CD82-Expression	48
Abb. 13: Proliferation der ektopen Läsionen.....	49
Abb. 14: Uterusgewichte der NOD-SCID Mäuse nach 10tägiger Behandlung	51
Abb. 15: Wachstumsverhalten der ektopen Läsionen	52
Abb. 16: Histomorphologische Analyse der ektopen Läsionen	53
Abb. 17: Expression verschiedener Dezidualisierungsmarker auf Transkriptionsebene	54
Abb. 18: Immunhistochemischer Nachweis der FOXO1-Expression.....	55
Abb. 19: Expressionsanalyse von GJA1.....	56
Abb. 20: Immunhistochemischer Nachweis der CD82-Expression	57
Abb. 21: Proliferation der ektopen Läsionen.....	58
Abb. 22: Uterusgewichte der NOD-SCID Mäuse nach Behandlung	59
Abb. 23: Wachstumsverhalten der ektopen Läsionen	60
Abb. 24: Histomorphologische Analyse der ektopen Läsionen	61
Abb. 25: Relative Expression von <i>dPRL</i> und <i>FOXO1</i> auf Transkriptionsebene.....	62
Abb. 26: Immunhistochemischer Nachweis der FOXO1-Expression.....	63
Abb. 27: Relative Expression von <i>GJA1</i> auf Transkriptionsebene	63
Abb. 28: Expressionsanalyse von GJA1 auf Proteinebene.....	64
Abb. 29: Immunhistochemischer Nachweis der CD82-Expression	65
Abb. 30: Proliferation der ektopen Läsionen.....	66
Abb. 31: Nachweis aktivierter Caspase 3	67

7.2 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
ACTB	β-Aktin
APS	Ammoniumpersulfat
Bp/kb	Basenpaare/Kilobasen
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD82/KAI-1	<i>cluster of differentiation 82</i>
cDNA	Complementary DNA (zur mRNA komplementäre DNA)
COX-1/2	Zyklooxygenase-1/2
C _t -Wert	<i>cycle threshold</i> -Wert
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dPRL	deziduales Prolaktin
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence (verstärkte Chemiluminiszenz)
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
et al.	et altera (und andere)
FOXO-1	Forkhead-Box-Protein O1
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GJA1	Gap Junction Protein alpha 1 (Connexin43)

GnRH	Gonadotrophin-Releasing-Hormon
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRP	Horse raddish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
IGFBP-1	Insulin-like growth factor-binding protein 1
IHC	Immunhistochemie
i.p.	intraperitoneal
kDa	Kilodalton
LH	Luteinisierendes Hormon
M-MLV RT	Moloney-murine leukemia virus reverse transcriptase
MPA	Medroxyprogesteronacetat
mRNA	<i>messenger</i> RNA (Boten-RNA)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOD	<i>non-obese diabetic</i>
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
PBS	Phosphat buffered saline (Phosphat-gepufferte Saline)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
Pen/Strep	Penicillin-/Streptomycin-Lösung
Poly-A	polyadenyliert
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
s.c.	subkutan
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin

T _m	Hybridisierungstemperatur der Primer bei der PCR
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
WB	Western Blot
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und physikalische Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich danke Frau Prof. Dr. Ruth Grümmer und Frau Prof. Dr. Elke Winterhager für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Molekularbiologie anfertigen zu können und für die intensive fachliche Unterstützung sowie für die Möglichkeit der Teilnahme an zahlreichen Kongressen und Tagungen, auf denen ich meine Arbeit präsentieren konnte. Im Speziellen danke ich Frau Prof. Dr. Ruth Grümmer für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gebührt allen Angehörigen des Instituts für Molekularbiologie für die Hilfsbereitschaft und die tolle Arbeitsatmosphäre. Dr. Alexander Gellhaus, Dr. Jessica Wagener, Stephanie Kaiser und Friederike Kipkeew danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft und die Hilfestellungen, die sie mir oftmals bei Problemen und Fragestellungen geleistet haben. An dieser Stelle möchte ich nicht versäumen, Gabriele Sehn, Ursula Schmücker, Claudine Kühn und Kathrin Kazuschke meinen besonderen Dank auszusprechen, da sie mich tatkräftig bei der Laborarbeit unterstützt und alle meine Fragen geduldig beantwortet haben.

Der Abteilung für Gynäkologie des Universitätsklinkums Essen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Kimmig danke ich für die Bereitstellung der Gewebeproben. Auch möchte ich mich bei der Abteilung Pathologie des Universitätsklinikums Essen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Schmid und hier besonders bei Frau Stephanie Levin für die Hilfe bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen recht herzlich bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihr Verständnis und ihre Unterstützung bedanken.

Die hier durchgeführten Arbeiten wurden von Bayer HealthCare Pharmaceuticals unterstützt.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.